

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Nikola Pokorná

STANOVENÍ SPECIÍ ARSENU V REFERENČNÍCH
MATERIÁLECH MOŘSKÉHO PŮVODU METODOU ICP-MS
S GENEROVÁNÍM HYDRIDŮ A VYMRAZOVÁNÍM

Determination of Arsenic Species In Seafood Reference Materials
by ICP-MS With Hydride Generation And Cryotrapping

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Tomáš Matoušek, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Jakub Hraníček, Ph.D.

Praha 2018

Tato diplomová práce vznikla ve spolupráci s Oddělením stopové prvkové analýzy Ústavu analytické chemie AV ČR, v.v.i. jako součást výzkumného záměru RVO: 68081715 a s podporou programu MŠMT Kontakt II, č. projektu LH 15174.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 18. května 2018

.....

Nikola Pokorná

Abstrakt a klíčová slova

Abstrakt:

Tato práce byla zaměřena na stanovení jednotlivých specií arsenu v certifikovaných referenčních materiálech mořského původu pomocí metody generování hydridů, jejich následné prekoncentrace ve vymrazovací trubici chlazené kapalným dusíkem s detekcí hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem.

Během ověřování metody byla pozorována vzájemná přeměna jednotlivých specií arsenu, konkrétně anorganického arsenu, monomethylarsenu a dimethylarsenu. Dalšími experimenty bylo zjištěno, že v přítomnosti matrice a peroxidu vodíku docházelo k demethylaci až ve fázi generování hydridů, nikoli během extrakce. Následně byl ověřen postup rozkladu peroxidu vodíku v extraktech pomocí katalázy. Ověřením, že již neprobíhá demethylace, byla stanovení s přídavky standardů jednotlivých specií.

Nalezeným postupem byly s dostatečnou citlivostí stanoveny specíe arsenu v referenčních materiálech z mořských živočichů, jejichž výsledné hodnoty jsou kompatibilní se srovnávacími analýzami téže laboratoře jinou metodou i s publikovanými literárními údaji.

Klíčová slova: speciační analýza, arsen, generování hydridů, mořské potraviny, hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem

Abstract:

The aim of this work was to determine chemical species of arsenic in sea originating certified reference materials. Measurements were done using method of hydride generation. Hydrides were preconcentrated in liquid nitrogen cooled tube and detected using inductively coupled plasma mass spectrometry.

During the testing of the method, mutual conversion of arsenic species was observed for inorganic arsenic, monomethyl arsenic and dimethylarsenic. Further study revealed that with presence of matrix and hydrogen peroxide, demethylation occurred only in hydride generation phase, not during extraction. Dissociation of hydrogen peroxide in extracts was verified using catalase. End of the demethylation process was proved using measurement with addition of arsenic species standards.

The newly invented procedure was used to determine arsenic species in reference materials with sufficient accuracy. Final results are compatible with results from different method, and already published results as well.

Key words: speciation analysis, arsenic, hydride generation, seafood, inductively coupled plasma mass spectrometry

Poděkování

Chci poděkovat RNDr. Tomáši Matouškovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a za pomoc při zpracování této práce.

Dále chci poděkovat RNDr. Jakubu Hraníčkoví, Ph.D. za všestrannou pomoc. Mé poděkování také patří vědeckému týmu z Oddělení stopové analýzy Ústavu analytické chemie AV ČR, v.v.i. za umožnění spolupráce, ochotu a vstřícný přístup.

Velké díky patří taktéž mé rodině za jejich podporu a možnosti studia na vysoké škole.

OBSAH

1.	ÚVOD	1
2.	TEORETICKÁ ČÁST	2
2.1	Arsen	2
2.1.1	Toxicita důležitých specií arsenu	3
2.2	Speciační analýza arsenu	5
2.2.1	Extrakce specií arsenu	5
2.2.2	Nejběžněji používané analytické metody	6
2.2.3	Generování hydridů a speciační analýza arsenu	8
2.2.4	Arsen v potravinách a materiálech mořského původu	9
2.2.5	Certifikované referenční materiály	10
3.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	12
3.1	Použité chemikálie	12
3.2	Příprava standardních roztoků	13
3.3	Příprava použitých činidel a pufru	14
3.4	Extrakce CRM	15
3.5	Rozklad peroxidu vodíku pomocí katalázy	16
3.5.1	Ověření nepřítomnosti peroxidu vodíku v roztoku	17
3.6	Přístrojové vybavení	17
3.7	Experimentální uspořádání	18
3.8	Zpracování dat	20
4.	VÝSLEDKY A DISKUZE	21
4.1	Analytické parametry metody	21
4.2	Potvrzení procesu demethylace v přítomnosti peroxidu vodíku	23
4.2.1	Rozklad peroxidu vodíku v roztoku	24
4.3	Analýza CRM po mikrovlnné extrakci	25
4.3.1	Analýza referenčního materiálu DORM-3 a DORM-4	26
4.3.2	Analýza referenčního materiálu TORT-3	28
4.3.3	Analýza referenčních materiálů DOLT-4 a DOLT-5	29
4.3.4	Analýza referenčního materiálu ERM-CE278k	33
4.3.5	Analýza referenčního materiálu PRON-1	37
4.3.6	Analýza referenčního materiálu SQID-1	40
5.	ZÁVĚR	44
6.	LITERATURA	45

SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

AAS	atomový absorpční spektrometr
AFS	atomový fluorescenční spektrometr
As	arsen
AsH ₃	arsan
As ^{III}	arsenitan
As ^V	arseničnan
CE	kapilární elektroforéza
cps	signál (counts per second)
CRM	certifikovaný referenční materiál
CT	vymrazování
DMAs	dimethylarsen
DMAs ^{III}	dimethylarsenitan
DMAs ^V	dimethylarseničnan
EFSA	European Food Safety Authority (Evropský úřad pro bezpečnost potravin)
GC	plynová chromatografie
HG	generování hydridů
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
IARC	International Agency for Research on Cancer (Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny)
iAs	anorganický arsen
iAs ^{III}	anorganický arsenitan
iAs ^V	anorganický arseničnan
IC	iontová chromatografie
ICP-MS	hmotnostní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem
ISIS	Integrated Sample Introduction System (programovatelný modul pro průtokovou analýzu)
LC	kapalinová chromatografie

LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
MAs	monomethylarsen
MAs ^{III}	monomethylarsenitan
MAs ^V	monomethylarseničnan
M _r	relativní molekulová hmotnost
SPE	extrakce na pevné fázi
TMAO	trimethylarsen oxid
Tris-HCl	tris(hydroxymethyl)aminomethan hydrochlorid

1. ÚVOD

Arsen je prvek, který je známý díky své toxicitě. Pro zjištění rizika nestačí znát koncentraci arsenu jako celku, ale je nutné zjistit, v jakém se nachází zastoupení jeho jednotlivých forem neboli specií. Významným zdrojem arsenu jsou potraviny živočišného, ale i rostlinného původu.

Tato práce je součástí širšího projektu, zabývajícího se vývojem metodik pro speciální analýzu arsenu. Jedná se o spolupráci analytické laboratoře Oddělení stopových prvkových analýz na Ústavu analytické chemie, v.v.i., s toxikologickou laboratoří na University of North Carolina v Chapel Hill (UNC) a s producentem certifikovaných referenčních materiálů z National Research Council Canada. Hlavní zaměření této práce je na speciální analýzu arsenu v materiálech mořského původu.

Tato práce byla pokračováním práce bakalářské, která byla ukončena závěrem, že extrakce pro speciální analýzu arsenu v certifikovaných referenčních materiálech rybího proteinu nejsou dostatečně účinné v případě použití pouze 2% kyseliny dusičné jakožto extrakčního činidla a že dochází k demethylaci mono- a dimethylovaných specií arsenu v případě použití navíc pomocného extrakčního činidla 3% peroxidu vodíku. Bylo tedy třeba tyto závěry potvrdit a učinit další kroky k nalezení vhodné extrakční procedury.

Cílem této diplomové práce bylo stanovit koncentrace různých vzorových matric analytickou metodou založenou na generování hydridů s vymrazováním a detekcí hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS). Také byla provedena úprava extrakční procedury a samotné přípravy extraktů před analýzou. Byly stanovovány toxikologicky významné specie, a to anorganický arsen, monomethylarsen a dimethylarsen. Byly analyzovány certifikované referenční materiály rybího proteinu DORM-3 a DORM-4, dále humří hepatopankreas TORT-3, žraločí játra DOLT-4 a DOLT-5, tkáň slávky jedlé ERM-CE278k, říční krevetka PRON-1 a sépie obecná SQID-1. Získané hodnoty z analýz těchto materiálů metodou HG-CT-ICP-MS byly porovnány s výsledky získanými na pracovišti Ústavu analytické chemie AV ČR, v.v.i pomocí metody HPLC-HG-AFS.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Arsen

Arsen je toxický metaloid, který se přirozeně vyskytuje v zemské kůře a v mnoha oblastech na celém světě. Fyzikální, chemické a mikrobiální změny v půdě mohou podpořit mobilizaci arsenu z minerálů a jeho akumulaci v podzemních vodách. Spotřeba kontaminované pitné vody je hlavním zdrojem expozice arsenu mnoha lidí v mnoha zemích¹.

Arsen je široce rozšířený kontaminant, který se vyskytuje volně v přírodě, ale jeho vznik je podmíněn i lidskou činností. V šedesátých letech minulého století bylo vědecky dokázáno, že vystavování se vyšším koncentracím anorganického arsenu může způsobit kožní léze s karcinogenním, ale i nekarcinogenním účinkem a může být toxický pro mnoho dalších orgánů. Dlouhodobé účinky primárně zahrnují respirační, hepatické či kardiovaskulární poruchy².

Kromě toho se arsen používá při různých průmyslových činnostech, včetně konzervace dřeva, elektroniky, pesticidů a dalších konzervačních prostředků³. Od použití pesticidů, herbicidů a fungicidů na bázi arsenu se již ustupuje⁴.

Jak bylo zmíněno, arsen způsobuje kontaminace pitné vody, ale můžeme ho nalézt i v potravinách⁵. Aby došlo k co nejvíce možnému vyhnutí se příjmu arsenu, je třeba stanovit jeho obsah. Stanovení celkové koncentrace arsenu není adekvátní, jelikož toxicita jeho jednotlivých forem neboli specií, se liší⁶. Sloučeniny trojmocného arsenu jsou mnohem toxičtější než sloučeniny pětímocného arsenu, naopak některé formy arsenu, například arsenobetain, který převládá v potravinách mořského původu, nebo arsenocholin, jsou považovány za netoxické^{5,7}.

2.1.1 Toxicita důležitých specií arsenu

Arsen je jedním ze stopových prvků, který se vyskytuje v životním prostředí. Mnoho studií prokázalo, že toxicita, redoxní stabilita, adsorpce, mobilita a biogeochemické působení úzce souvisí s jeho redoxními stavy a jeho existujícími formami⁸.

Na základě chemických vlastností arsenu se specie arsenu dělí mezi látky rozpustné v tucích a rozpustné ve vodě, a to jak anorganické, tak i organické sloučeniny⁹.

V materiálech biologického původu je arsen přítomen v různých sloučeninách, přičemž se v nich může nacházet až dvacet různých specií¹⁰.


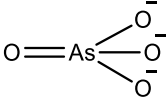
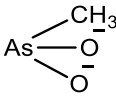
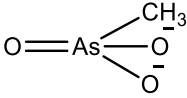
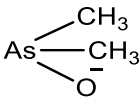
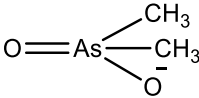
Toxikologicky nejvýznamnější jsou formy anorganického arsenu, a to arsenitany As^{III} a arseničnany As^{V} (cit. ¹¹). Arsenitany As^{III} jsou více rozpustné a toxičtější než arseničnany As^{V} (cit. ¹²). Methylované formy arsenu, do kterých patří monomethylarsenitan MAs^{III} , monomethylarseničnan MAs^{V} , dimethylarsenitan DMAs^{III} a dimethylarseničnan DMAs^{V} , jsou méně toxické pro člověka¹³. Tyto methylované specie jsou běžné metabolity anorganického arsenu, které se intracelulárně tvoří ve většině organismů. Trojmocné formy arsenu MAs^{III} a DMAs^{III} jsou mnohem toxičtější než pětímocné specie MAs^{V} a DMAs^{V} (cit. ¹⁴).

Toxicita arsenu odpovídá následujícímu sestupnému pořadí – arsany, anorganické arsenitany, organické trojmocné sloučeniny, anorganické arseničnany, organické pětímocné sloučeniny, elementární arsen¹². V potravinách mořského původu byl identifikován arsenobetain jako hlavní zdroj arsenu¹⁵. Arsenobetain je vysoce stabilní látka, takže se nemetabolizuje a nerozpadá. Zdroj arsenobetainu je nejasný, je však řada teorií o biosyntetické dráze jeho tvorby¹⁶.

Další složitější organické sloučeniny jako jsou arsenocukry nebo arsenolipidy jsou také přítomny ve významných množstvích u některých druhů mořských živočichů¹⁷. Arsenocukry jsou spojovány hlavně s mořskými řasami, kde se arsen vyskytuje převážně v této formě, bývá to až 80 % z celkového množství arsenu¹⁸.

V tabulce 2.1 jsou zobrazeny strukturní vzorce toxických specií arsenu.

Tab. 2.1: Toxikologicky významné specíe arsenu.

název sloučeniny	strukturní vzorec
anorganický arsenitan	 iAs ^{III}
anorganický arseničnan	 iAs ^V
monomethylarsenitan	 MAs ^{III}
monomethylarseničnan	 MAs ^V
dimethylarsenitan	 DMAs ^{III}
dimethylarseničnan	 DMAs ^V

2.2 Speciační analýza arsenu

Chemické specie jsou specifické formy prvku, které mají definované chemické a fyzikální vlastnosti – izotopové složení, elektronový nebo oxidační stav a komplexní nebo molekulární strukturu. Díky speciační analýze jsme schopni identifikovat a kvantifikovat jednu nebo více chemických specií ve vzorku.

Speciační analýza arsenu se stává více významnou, je značně důležitá z důvodu všudypřítomného výskytu sloučenin arsenu v životním prostředí spojené s karcinogenními účinky působící na lidský organismus¹⁹.

Z důvodu velké různorodosti toxicity specií je speciační analýza arsenu důležitá nejen ke studování právě toxicity daných specií, ale je význačné také studium jejich transformace, biologické dostupnosti a potenciálních dopadů na životní prostředí a lidské zdraví. Proto je potřeba rozvíjet citlivé a jednoduché analytické metody pro speciační analýzu arsenu v různých vzorcích zaměřených právě na životní prostředí i bezpečnost potravin²⁰.

2.2.1 Extrakce specií arsenu

Ve většině případů je ve speciační analýze nutností převést specie arsenu daného analytu do roztoku, tudíž je třeba vzorky extrahovat. Hlavním požadavkem je co nejúčinnější uvolnění všech přítomných specií do roztoku. Během této procedury nesmí dojít k rozkladu či přeměně specií, takže je potřeba použít šetrnou a nedestruktivní techniku extrahování.

Extrahovat tyto specie v materiálech mořského původu je poměrně obtížné, jelikož je třeba, aby během tohoto procesu nedocházelo ke změnám daných forem. Účinnost extrakce závisí na různých parametrech – na typu vzorku, na vybraném extrakčním činidle, také na druhu extrahovaných specií, na době extrakce a na teplotě²¹.

Bylo zkoumáno mnoho způsobů extrakcí pro vzorky mořského materiálu, zatím ale stále není vyvinuta jedna univerzální extrakční metoda. Je používáno různých extrakčních činidel, včetně různých zředěných kyselin, vody nebo methanolu. Jako extrakční procedura je nejčastěji používána ultrazvuková nebo mikrovlnná extrakce²².

Jsou publikovány a ověřeny extrakční metody pro speciační analýzu arsenu některých referenčních materiálů.

V předchozí bakalářské práci²³ jsou popsány a porovnány různé extrakční procedury z různých publikací pro referenční materiál DORM-3.

V práci Pétursdóttir et al.²⁴ je popsáno studium osmi různých extrakčních metod, přičemž z doporučeného postupu vycházela i procedura použita v bakalářské práci a nyní je použita i v diplomové práci.

Extrakční procedura byla prováděna v mikrovlnném zařízení pro stanovení iAs v certifikovaných referenčních materiálech TORT-2, DORM-3 a DOLT-4 a jako extrakční činidlo byla použita 2% kyselina dusičná s přidaným pomocným extrakčním činidlem 3% peroxidem vodíku. Účinnost extrakce byla vyhodnocena porovnáním koncentrace celkového arsenu oproti publikovaným hodnotám v certifikovaných referenčních materiálech. Nejnižších hodnot extrakční účinnosti bylo dosaženo pro vzorek DOLT-4, které byly v rozmezí od 62 do 78 %. Nejvyšší extrakční účinnosti dosahovaly hodnoty ležící mezi 86 – 95 %, a to pro vzorek TORT-2 (cit. ²⁴).

2.2.2 Nejběžněji používané analytické metody

Nejčastěji používanými analytickými metodami pro separaci a kvantifikaci sloučenin arsenu jsou rozdělovací techniky založené na kombinaci chromatografické separace s prvkově selektivním detektorem. Nejčastěji to bývá vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), plynová chromatografie (GC) či kapilární elektroforéza (CE) v kombinaci s atomovým fluorescenčním spektrometrem (AFS), atomovým absorpčním spektrometrem (AAS) nebo s hmotnostním detektorem s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS).²⁰

Plynová chromatografie (GC) poskytuje dobrou separační kapacitu pro těkavé arsany, ale jeho aplikace jsou limitované, jelikož většina přírodně vyskytujících se specií arsenu jsou netěkavé a musí být derivatizovány před analýzou. Derivatizace však může způsobit úbytek analytu nebo transformaci specií²⁵.

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) spojená s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) je nejčastěji používané uspořádání pro speciální analýzu arsenu v různých matricích. Dohromady mohou tyto nástroje separovat a detekovat různé formy arsenu s velmi nízkými detekčními limity²⁶. Výhodou této metody je možnost identifikovat široké spektrum specií arsenu a je velmi specifická²⁷.

Z důvodu nízkého rozlišení je HPLC často problematická speciálně pro stanovení vzorků biologického materiálu²⁸. Další nevýhodou této metody je také cena a dostupnost v rutinních laboratořích²⁰.

Iontově výměnná chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem s indukčně vázaným plazmatem (IC-ICP-MS) nabízí velké výhody v případě analýz specií arsenu, a to včetně specifické detekce a výborné citlivosti. Nízké detekční limity (pohybující se v řádu ng g^{-1}) pro speciaci arsenu v biologických a environmentálních vzorcích umožňují průběh analýzy bez předchozích prekoncentračních či derivatizačních kroků²⁹.

Iontově výměnná chromatografie je používána primárně k oddělení iontů a snadno ionizovaných látek. Využívá mechanismus výměny rovnováhy mezi stacionární fází, která obsahuje povrchové ionty a mobilní fází obsahující opačně nabitě ionty. Je používána isokratická i gradientová eluce pro separaci sloučenin arsenu. Ve spojení s ICP-MS jsou více používány isokratické systémy separace, ale gradientové separace obecně dosahují lepšího rozlišení specií arsenu³⁰. Aniontová a kationtová výměnná chromatografie byly vyvinuty právě hlavně k separaci specií arsenu. V závislosti na iontových vlastnostech sloučenin arsenu se aniontová výměnná chromatografie stala nejčastěji používanou metodou k analýze As^{III} , As^{V} , MAs^{V} a DMAs^{V} a kationtová výměnná chromatografie je nejčastěji používána v případě stanovení arsenobetainu, arsenocholinu či trimethylarsen oxidu (TMAO)³¹.

Pro speciační analýzu arsenu je také používána kombinace aniontové a kationtové výměnné chromatografie. Tento způsob je popsán v publikaci Milstein et al.³², kde byla studována separace As^{III} , As^{V} , MAs^{V} , DMAs^{V} , arsenobetainu a arsenocholinu. Byly použity dvě kolony, kationtová a aniontová kolona, které byly připojeny za sebou³⁰. Tato metoda byla použita ke stanovení vzorků vody³³.

Další používanou metodou je kapilární elektroforéza (CE) a v porovnání s kapalinovou chromatografií nebo plynovou chromatografií má několik výhod, například vysokou separační účinnost či relativně rychlý průběh analýzy. Pro stanovení a kvantifikaci arsenu je ideální spojení kapilární elektroforézy s ICP-MS. Tato kombinace nabízí excelentní citlivost nebo rychlé odezvy detektoru na stanovovaný analyt. Díky těmto vynikajícím vlastnostem tato metoda poskytuje stanovení specií arsenu v mnoha matricích³⁴. Úspěšně byla tato metoda aplikována při stanovení certifikovaných referenčních materiálů TORT-2 a DORM-3, vzorků podzemních vod, bylinných rostlin nebo také vzorků kuřecího masa²⁰.

2.2.3 Generování hydridů a speciální analýza arsenu

Alternativním postupem metody HPLC-ICP-MS je ultra citlivá metoda založená na selektivním generování hydridů (HG) s jejich prekoncentrací ve vymrazovací trubici (CT) a hmotnostní detekcí s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS). Stanovení specií arsenu selektivním generováním se provádí bez preredukce pouze pro trojmocné specie. Pro pětímocné specie, či součet trojmocných s pětímocnými, je nutné provést preredukci L-cysteinem. Specie jsou přeměněny na těkavé arsany, které jsou prekoncentrovány ve vymrazovací trubici, a ta je chlazená kapalným dusíkem. Jednotlivé arsany jsou při zahřívání odděleny a podle svého bodu varu postupně odcházejí do detektoru. Analyty z relativně velkého objemu jsou zakoncentrovány do úzkého píku, a to hlavně díky nízkým hodnotám meze detekce³⁵.

Hodnoty meze detekce pro specie arsenu se pohybují v rozmezí 1,1 – 6,5 ng mL⁻¹ pro spojení s AAS detektorem³⁶. Hodnoty meze detekce pro specie arsenu ve spojení s ICP-MS detektorem se pohybují v rozmezí desítek pg až ng mL⁻¹ (cit. ¹²). Další velkou podstatnou výhodou je, že se methyl-substituované arsany během extrakce nepřeměňují³⁷. Také není třeba provádět filtraci vzorků, jelikož vymrazovací (CT) systém umožňuje vzorek měřit ve formě suspenze³⁸.

Nevýhodou této metody je omezená selektivita, jelikož při kroku vymrazování jsou rozlišovány pouze některé druhy těkavých specií, a to arsany, mono-, di- a trimethyl arsany. Krok generování hydridů je hlavním důvodem, proč je tato metoda natolik selektivní. Některé druhy specií arsenu totiž netvoří hydridy vůbec. Při hodnotě pH = 6 netvoří hydridy pětímocný iAs^V a MAs^V, DMAs^V tvoří hydridy jen z 5 – 8 %. Oproti tomu trojmocné specie iAs^{III}, MAs^{III} a DMAs^{III} se převedou na hydridy kvantitativně³⁹.

Proces generování hydridů je prováděn v řízeném režimu a je dosahováno téměř 100% účinnosti u všech hydridů arsenu tvořící specie. Kromě toho může být kvantifikace všech specií arsenu dosažena pomocí jedné nebo více stabilních a snadno dostupných sloučenin. Dají se provádět analýzy vysoce nestálých trojmocných arsenů, jelikož není třeba žádná úprava vzorku³⁶.

Metoda selektivního generování hydridů je široce rozšířena nejen při analýzách arsenu, ale také antimonu či selenu. Různé odezvy jsou získané s ohledem na účinnost generování a funkčnosti redukčního činidla. Anorganický arsen je efektivně redukován na iAs^{III} a generuje se na arsan (AsH₃)⁴⁰.

Co se týká instrumentace, tak spojení HG s AAS je velmi používaným postupem pro stanovení As a to zejména kvůli nízké ceně a univerzálnosti AAS⁴¹. Výhoda této metody je selektivní stanovení bez nutnosti předchozích separací specií. Metoda HG-AAS se používá ke stanovení iAs v krmenech pro zvířata, mořských potravinách nebo také v rýži⁴².

2.2.4 Arsen v potravinách a materiálech mořského původu

Nejčastějším zdrojem příjmu arsenu v lidském těle je pitná voda¹². Druhým hlavním zdrojem příjmu arsenu pro lidskou populaci jsou potraviny. Produkty živočišného nebo rostlinného původu jako jsou ryby, rýže, mořské potraviny, zelenina nebo vejce, mohou být kontaminovány arsenem²⁶. Ve Spojených státech amerických nebo v Číně byla přísadami obsahujícími arsen krmna prasata, kuřata či dobytek, jelikož to má pozitivní účinek pro jejich rychlejší růst a zároveň funguje jako léčba proti parazitům. Ovšem tyto látky mohou být vstřebány a přeneseny do jejich svalů nebo vajec⁴³. Evropská organizace European Food Safety Authority (EFSA) proto upozorňuje na důležitost kontrolování koncentrace organického i anorganického arsenu v potravinách⁵.

Potraviny mořského původu obsahují větší množství celkového arsenu a bylo zde identifikováno více než 50 druhů různých specií arsenu, což je více než v potravinách pozemních⁴⁴. Specie anorganického arsenu jsou přítomny v relativně nízkých koncentracích z celkového množství arsenu⁴⁵. Nicméně byly také nalezeny vysoké koncentrace v některých druzích mořských potravin, například v tkáních slávky jedlé, které dosahují hodnot až 5 mg As kg⁻¹ (cit. ⁴⁶)

Země, jako jsou Nový Zéland nebo Austrálie, mají stanovenou legislativu pro maximální koncentrace anorganického arsenu v potravinách mořského původu, a to 2 mg kg⁻¹ pro korýše a ryby a 1 mg kg⁻¹ pro měkkýše a mořské řasy⁴⁷.

Evropská unie nemá stanoveny limity pro celkový nebo anorganický arsen obsažený v rybách nebo potravinách mořského původu⁴⁸. Nastavení limitu by mělo vycházet z toxicity různých specií arsenu. Anorganický arsen je považován za nejvíce toxickou formu arsenu v potravinách a krmivech a je klasifikován Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny (IARC) jako karcinogen⁴⁹. Avšak většinové množství arsenu v rybách se vyskytuje ve formě arsenobetainu, který je považován za netoxický.

Kvůli této složitosti a různorodosti toxicity specií arsenu je obtížné tento limit nastavit⁵⁰. Feldman a Krupp navrhli možnou strategii rozdělení toxicitu arsenu do tří kategorií. Skupina 1 – specie anorganického arsenu, skupina 2 – netoxický arsenobetain a skupina 3 – potenciálně toxické frakce¹³.

2.2.5 Certifikované referenční materiály

Certifikované referenční materiály jsou určeny především k vývoji metod pro stopové prvkové analýzy kovů v mořské fauně a materiálů podobné matrice.

Referenční materiály DORM-3 a DORM-4 byly připraveny z lyofilizovaného a rozemletého homogenátu rybího proteinu.

Referenční materiál TORT-3 byl připraven z humřího hepatopankreatu, který byl homogenizován, odtučněn prostřednictvím hexanu a nakonec vysušen.

Referenční materiály DOLT-4 a DOLT-5 byly připraveny z rozdrcených lyofilizovaných žraločích jater.

Referenční materiál ERM-CE278k byl připraven z lyofilizovaných tkání slávky jedlé, které byly vysušeny na jemný prášek.

Referenční materiál PRON-1 byl připraven z thajských říčních krevetek, jejichž skořápky, ocásky a hlavy byly odděleny od těl, která byla následně sušena na vzduchu. Nakonec byly homogenizovány, lyofilizovány a uzavřeny do nádob.

Referenční materiál SQID-1 byl připraven z těl sépie obecné, která byla homogenizována, lyofilizována, dále bylo extrahováním pomocí hexanu provedeno odtučnění a sušení na vzduchu.

Všechny tyto referenční materiály byly po své úpravě sterilizovány a uchovány v hnědých skleněných malých nádobách s gumovou vložkou navrchu a uzávěrem.

Certifikované hodnoty celkového obsahu arsenu a arsenobetainu pro tyto referenční materiály jsou znázorněny v tabulce 2.3. Pro materiály DORM-3, DOLT-4 a ERM-CE278k nejsou certifikovány hodnoty pro arsenobetain. Jiné specie, především anorganický arsen, nejsou pro žádný z těchto referenčních materiálů certifikovány.

Tab.2.3: Certifikované hodnoty referenčních materiálů.

CRM	celkový obsah arsenu, mg kg ⁻¹	arsenobetain
DORM-3	6,88 ± 0,30	-
DORM-4	6,87 ± 0,44	3,95 ± 0,36
TORT-3	59,50 ± 3,80	54,90 ± 2,50
DOLT-4	9,66 ± 0,62	-
DOLT-5	34,60 ± 2,40	24,20 ± 0,80
PRON-1	1,73 ± 0,12	1,20 ± 0,06
SQID-1	14,10 ± 2,20	13,96 ± 0,54
ERM-CE278k	6,70 ± 0,40	-

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

- deionizovaná voda získaná ze zařízení ULTRAPUR (Watrex, USA)
- certifikovaný referenční materiál – rybí protein DORM-3 (National Research Council Canada)
- certifikovaný referenční materiál – rybí protein DORM-4 (National Research Council Canada)
- certifikovaný referenční materiál – humří hepatopankreas TORT-3 (National Research Council Canada)
- certifikovaný referenční materiál – žraločí játra DOLT-4 (National Research Council Canada)
- certifikovaný referenční materiál – žraločí játra DOLT-5 (National Research Council Canada)
- certifikovaný referenční materiál – tkáň slávky jedlé ERM-CE278k (Institute for Reference Materials and Measurements)
- certifikovaný referenční materiál – říční krevetky PRON-1 (National Research Council Canada)
- certifikovaný referenční materiál – sépie obecná SQID-1 (National Research Council Canada)
- kyselina dusičná, Suprapur, 65% (HNO_3 ; $M_r = 63,01$; Merck, Německo)
- peroxid vodíku, p.a., $\geq 30\%$ (H_2O_2 ; $M_r = 34,01$; Sigma-Aldrich, Německo)
- L-cystein hydrochlorid monohydrát pro biochemii ($\text{C}_3\text{H}_8\text{ClNO}_2\text{S} \cdot \text{H}_2\text{O}$; $M_r = 175,64$; Merck, Německo)
- hydroxid draselný, chemicky čistý (KOH ; $M_r = 56,11$; Lachner, ČR)
- hydroxid sodný, chemicky čistý (NaOH ; $M_r = 39,99$; Lachner, ČR)
- tetrahydridoboritan sodný, peletky, p.a., $\geq 97,0\%$ (NaBH_4 ; $M_r = 37,83$; Sigma-Aldrich, Německo)
- Kataláza (Sigma-Aldrich, Německo)

- Manganistan draselný, chemicky čistý (KMnO_4 ; $M_r = 158,03$; Lachema, ČR)
- Kyselina sírová, chemicky čistá, 96% (H_2SO_4 ; $M_r = 98,08$; Lachner, ČR)
- Dihydrát kyseliny šťavelové ($(\text{COOH})_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$; $M_r = 126,07$; Merck; Německo)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan chlorid (Trizma[®] hydrochloride; $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3 \cdot \text{HCl}$; $M_r = 157,60$; Sigma-Aldrich; Německo)
- Antifoam B (Sigma-Aldrich, Německo)
- Triton[®] X 100 (Sigma-Aldrich, Německo)
- argon v kapalném stavu, 99,996% (SIAD, ČR)
- helium, 99,998% (SIAD, ČR)

3.2 Příprava standardních roztoků

Zásobní roztok iAs^{III} o koncentraci 1000 mg L^{-1} byl připraven rozpuštěním oxidu arsenitého (As_2O_3 ; $M_r = 197,84$; Lachema, ČR) v 1 ml 10% roztoku hydroxidu draselného a následně byl zředěn v deionizované vodě.

Zásobní roztok MAs^{V} o koncentraci 1000 mg L^{-1} byl připraven rozpuštěním hexahydrátu metylarseničnanu disodného ($\text{Na}_2\text{CH}_3\text{AsO}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$; $M_r = 291,99$; Chem Service, USA) v deionizované vodě.

Zásobní roztok DMAs^{V} o koncentraci 1000 mg L^{-1} byl připraven rozpuštěním kyseliny dimethylarseničné ($\text{H}(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2$; $M_r = 137,99$; Chem Service, USA) v deionizované vodě.

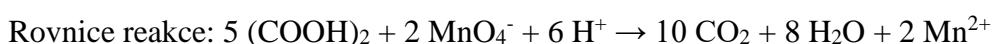
Zředěním denionizovanou vodou byly připraveny zásobní standardní roztoky o koncentraci 10 mg L^{-1} .

Z těchto tří standardních roztoků byl připraven směsný standardní roztok iAs^{III} , MAs^{V} a DMAs^{V} , který byl zředěn v 0,2% kyselině dusičné na výslednou koncentraci $50 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$. Ze směsného arsenového standardu byly přesným ředěním před každým měřením připraveny čerstvé kalibrační standardy iAs^{III} , MAs^{V} a DMAs^{V} o třech různých koncentracích, a to 125 ng L^{-1} , 250 ng L^{-1} a 500 ng L^{-1} nebo 500 ng L^{-1} , 1000 ng L^{-1} a 2000 ng L^{-1} dle typu měřeného CRM.

Jako vnitřní standard pro ICP-MS byl použit roztok telluru o koncentraci $100 \mu\text{g L}^{-1}$, který byl připraven ze zásobního standardního roztoku telluru (BDH; Anglie) o koncentraci 1000 mg L^{-1} přesným sériovým ředěním 0,2% kyselinou dusičnou.

3.3 Příprava použitých činidel a pufru

Roztok manganistanu draselného o přesné koncentraci asi $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ byl stanoven standardizací pomocí základní látky kyseliny dihydrogen šťavelové. Kyselinu dihydrogen šťavelovou bylo nutno před titrací zahřát až téměř k varu a titrace byla provedena v silně kyselém prostředí kyseliny sírové do prvního stálého růžového zbarvení.



Roztok manganistanu draselného byl před samotnou standardizací uchován v tmavé skleněné odměrné baňce obalené alobalem a byl uložen týden před použitím ke stabilizaci.

Roztok 1% tetrahydridoboritanu sodného (m/v) v 0,1% hydroxidu draselném byl při analýze použit jako redukční roztok, do něhož byl navíc přidán Antifoam B (250 μl 10% (v/v) na 100 ml roztoku) pro zamezení účinku pění. Roztok byl ředěn pomocí deionizované vody a byl denně připravován čerstvý.

Tris-HCl pufr o koncentraci $0,75 \text{ mol L}^{-1}$ byl upraven na hodnotu $\text{pH} = 6$ pomocí hydroxidu draselného (m/v).

Enzym kataláza (3200 U mL^{-1}) byl použit pro rozklad peroxidu vodíku ve vzorcích extraktů, byl ředěn deionizovanou vodou ($50 \mu\text{l mL}^{-1}$) a byl připravován před každou analýzou čerstvý. Naředěný roztok katalázy se přidával k extrakčním slepým vzorkům a vzorkům extraktů před redukcí L-cysteinu.

Roztok 2,5% hydroxidu amonného byl použit k neutralizaci 2% kyseliny dusičné, která byla přítomna ve vzorcích extraktů.

Roztok byl připravován ředěním z 25% hydroxidu amonného a kontrola neutralizace byla provedena prostřednictvím pH papírků.

Roztok 4% L-cysteinu (m/v) byl použit jako preredukční činidlo slepých vzorků, standardních roztoků a vzorků extraktů. Do roztoku byl navíc přidán Triton® X 100 (5 ml 10% (v/v) na 25 ml roztoku) a Antifoam B (2,5 ml 10% (v/v) na 25 ml roztoku) opět pro zamezení pění. Preredukční roztok byl doplněn deionizovanou vodou a připravoval se vždy před analýzou čerstvý. Standardy a slepý vzorek s ním reagovaly po smíchání v poměru 1:1 minimálně šedesát minut při pokojové teplotě. Vzorky extraktů obsahující iAs^V, MAs^V a DMAs^V byly smíchány s 10% roztokem L-cysteinu (m/v) a reagovaly v poměru 1:5 při stejných podmínkách.

3.4 Extrakce CRM

Pro studium demethylace specií byly provedeny experimenty s přidávkou iAs, MAs a DMAs, které byly přidány k extraktům před samotnou analýzou, pro materiál DORM-3 byly přidány i před provedením extrakce.

Do skleněných extrakčních zkumavek bylo přesně naváženo asi 0,2 g vzorku DORM-3, k němuž bylo přidáno 5 ml extrakčního činidla, kterým byla 2% kyselina dusičná s přidavkem pomocného extrakčního činidla 3% peroxidu vodíku. K jedné sérii vzorků bylo přidáno 50 µl MAs a DMAs o koncentracích 100 µg L⁻¹. Následně byla provedena třicetiminutová extrakce vzorků bez přidavku standardů i s jejich přidavkem v mikrovlnném zařízení UltraWave. Zařízení bylo nejprve potřeba natlačit na hodnotu 25 bar prostřednictvím dusíku z tlakové lahve a poté proběhlo postupné ohřívání po dobu deseti minut na 90 °C, následně bylo deset minut konstantně drženo na teplotě 90 °C a nakonec došlo k ochlazení zpět na teplotu 21 °C též po dobu deseti minut. Po ukončení extrakce byly vzorky kvantitativně převedeny do 50 ml polypropylenových zkumavek, zředěny do 10 ml deionizovanou vodou, uchovány a připraveny k analýze v lednici.

Před extrakcí vzorků DORM-4, TORT-3, DOLT-5, DOLT-4, ERM-CE278k, PRON-1 a SQID-1 bylo naváženo přesně asi 0,2 g vzorků těchto CRM, k nimž bylo přidáno 10 ml extrakčního činidla 2% kyseliny dusičné s přidáním 3% peroxidem vodíku. Extrakční procedura proběhla stejným způsobem jako u vzorku DORM-3. Po ukončení extrakce byly vzorky kvantitativně převedeny do 50 ml propylenových

zkumavek, zředěny do 20 ml deionizovanou vodou a byly uchovávány v lednici k jejich následné analýze. Před analýzou byly tyto vzorky neutralizovány 2,5% hydroxidem amonným, byla přidána kataláza k odstranění nepříznivých účinků peroxidu vodíku a nakonec byl použit preredukční roztok L-cysteinu s přidávanými protipěněními činidly.

Pro vzorky DOLT-5, ERM-CE278k, PRON-1 a SQID-1 byla provedena analýza extraktů se dvěma různými přídávky standardů iAs, MAs a DMAs. Přídávky standardů se pro jednotlivé materiály lišily dle koncentrace jejich specií a jejich rozsahu kalibrační křivky. Pro materiály DOLT-5 a ERM-CE278k bylo přidáno 15 μl 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ iAs^{III}, MAs^V, DMAs^V (600 ng L^{-1} / 2,5 ml vzorku) a 30 μl 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ iAs^{III}, MAs^V a DMAs^V (1200 ng L^{-1} / 2,5 ml vzorku). Pro materiály PRON-1 a SQID-1 byl přídavek standardů 5 μl 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ iAs^{III}, MAs^V, DMAs^V (200 ng L^{-1} / 2,5 ml vzorku) a 10 μl 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ iAs^{III}, MAs^V, DMAs^V (400 ng L^{-1} / 2,5 ml vzorku). Tyto přídávky byly přidávány po extrakci vzorků během jejich úpravy před analýzou, konkrétně před redukcí L-cysteinem.

Účinnost extrakce v těchto materiálech byla ověřena analýzami celkového obsahu arsenu v extraktu a po úplném rozkladu na Ústavu analytické chemie, AV ČR, v.v.i.⁵⁸

3.5 Rozklad peroxidu vodíku pomocí katalázy

Extrakt vzorku DORM-3 s extrakčním činidlem 2% kyseliny dusičné a přidáním pomocným činidlem 3% peroxidem vodíku byl použit k ověření účinku katalázy. Bylo pipetováno 0,5 ml vzorku, který byl zředěn do 2,5 ml deionizovanou vodou, tedy v poměru 1:5. Do zředěného extraktu bylo přidáno 0,080 ml 2,5% hydroxidu amonného na zneutralizování 2% kyseliny dusičné v extraktu, poté bylo přidáno 125 μl katalázy (50 $\mu\text{l/ ml}$). Následně byla provedena titrace tohoto vzorku pomocí již standardizovaného odměrného roztoku manganistanu draselného.

Do titrační baňky byl pipetován 1 ml extraktu s již přidanou katalázou a hydroxidem amonným, dále byly přidány 4 ml kyseliny sírové o koncentraci 4 mol L^{-1} a deionizovaná voda. Titrace byla provedena celkem třikrát do prvního stálého růžového zabarvení. Tento postup byl převzat od RNDr. Karla Marschnera, Ph.D. z Ústavu akademie věd AV ČR.

3.5.1 Ověření nepřítomnosti peroxidu vodíku v roztoku

Extrakt vzorku DORM-3 s extrakčním činidlem 2% kyselinou dusičnou a pomocným činidlem 3% peroxidem vodíku ze dne 15.2.2017 byl použit k ověření nepřítomnosti peroxidu vodíku v roztoku. Byly provedeny tři titrace pro neředěný extrakt a tři titrace pro extrakt naředěný v poměru 1:5 s deionizovanou vodou. K neředěnému i ředěnému extraktu bylo přidáno spočítané množství 2,5% hydroxidu amonného k neutralizaci 2% kyseliny dusičné v extraktu. Neutralizace byla ještě ověřena pH papírkem a následně bylo přidáno spočítané množství katalázy. Pro oba typy extraktů byl použit stejný postup titrace. Do titrační baňky byl pipetován 1 ml extraktu s již přidanou katalázou a 2,5% hydroxidem amonným, byly přidány 4 ml kyseliny sírové (4 mol L^{-1}) a deionizovaná voda. Titrace probíhala do prvního stálého růžového zabarvení.

Titrace bez neutralizace roztoku byla provedena obdobným postupem.

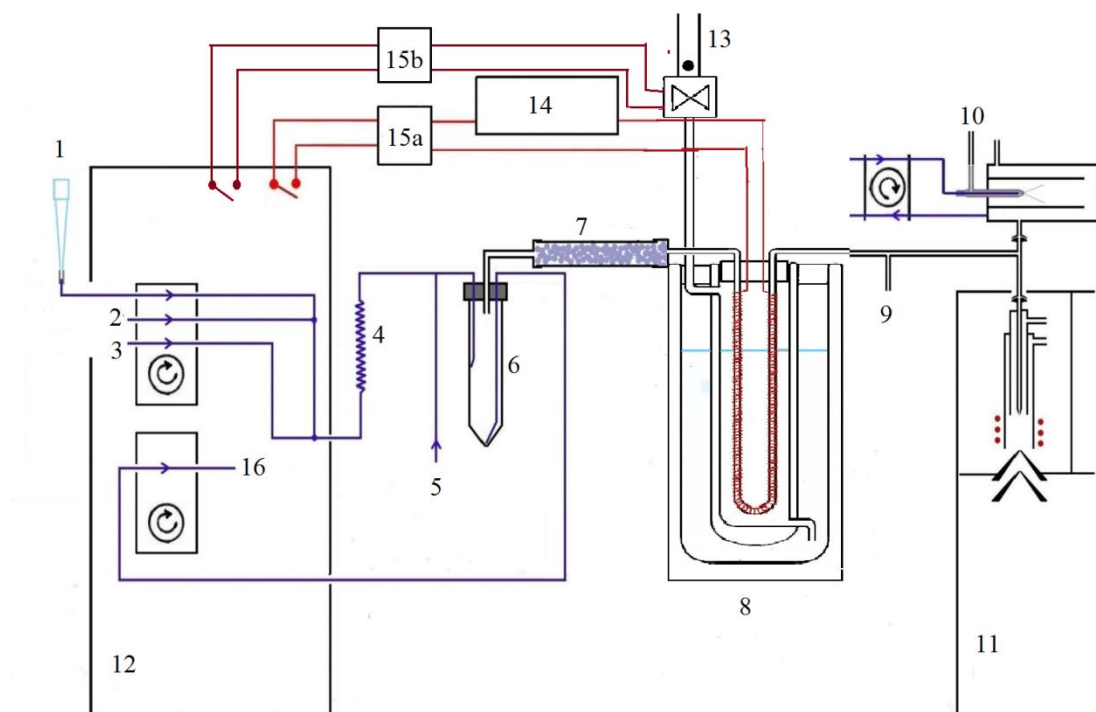
3.6 Přístrojové vybavení

- předvážky 600-2r s přesností 0,01 g (Kern, Německo)
- analytické váhy ABT 220-5DM s přesností 0,00001 g (Kern, Německo)
- automatické pipety (Biohit, Finsko)
- hmotnostní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem 7700 Series (Agilent Technologies, USA)
- zařízení na čištění vody ULTRAPUR (Watrex, USA)
- extrakční zařízení UltraWAVE (Milestone, Itálie)
- hmotnostní průtokoměry – zařízení na sledování průtoku nosného plynu (Omega Engineering, Inc., USA)
- laboratorní zdroj napětí (Electro-Automatik GmbH & Co. KG, Německo)

3.7 Experimentální uspořádání

Analýzy vzorků byly provedeny pomocí HG-CT-ICP-MS.

Znázornění experimentálního uspořádání bylo převzato z bakalářské práce²³ a z publikace Matoušek et al.³⁵ a je znázorněno na obrázku 3.1.



Obr. 3.1: Schématické experimentální uspořádání systému HG-CT-ICP-MS.

1 – dávkování vzorku, 2 – čerpání Tris-HCl pufru pomocí peristaltického čerpadla, 3 – čerpání tetrahydridoboritanu sodného pomocí peristaltického čerpadla, 4 – reakční cívka, 5 – přívod helia, 6 – separátor fází, 7 – sušící trubice s hydroxidem sodným, 8 – vymrazovací zařízení s kapalným dusíkem, 9 – přívod ředícího plynu, 10 – zmlžování roztoku vnitřního standardu, 11 – ICP-MS, 12 – ISIS (programovatelný modul pro průtokovou analýzu), 13 – solenoidový ventil, 14 – laboratorní zdroj napětí, 15a,b – spínací relé, 16 – odčerpávání reakční směsi peristaltickým čerpadlem.

HG-CT-ICP-MS proces: Vzorek byl nadávkován pomocí automatické pipety do pipetovací špičky, která byla připojená k peristaltické pumpě. Proud vzorku byl míchán s proudem Tris-HCl pufru a s roztokem tetrahydridoboritanu sodného. Dále došlo k přeměně specií arsenu na plynné arsany, které se od kapaliny oddělily v separátoru fází. Tato vzniklá plynná fáze byla sušena v polyethylenové trubici hydroxidem sodným.

Vymrazovací zařízení se skládalo z křemenné U-trubice, která byla ponořena do Dewarovy nádoby s kapalným dusíkem uvnitř. Trubice byla uzavřena v evakuované dvoupplášťové nádobě s vývody nahoře a dole. Horní vývod byl uzavíratelný solenoidovým ventilem ovládaným modulem pro průtokovou analýzu (ISIS), který je součástí ICP-MS. Otevření vývodu způsobilo chlazení U-trubice díky přítomnosti kapalného dusíku. Uzavřením tohoto vývodu po ukončení generování hydridů byl kapalný dusík vytěsněn odpařujícím se plynem ven z nádoby. Dále byla U-trubice zahřívána napětím 25 V kontrolovaným pomocí laboratorního zdroje. Zahřívání se spínalo prostřednictvím ISIS modulu přes relé. Vystupující nosný plyn z U-trubice byl vpuštěn do proudu ředícího plynu, který vstupuje mezi mlžnou komoru a plazmový hořák. Zároveň byl zmlžován roztok vnitřního standardu, což zajišťuje robustnější podmínky vlhkého plazmatu. Jelikož by mohlo docházet k interferenci iontů ArCl^+ , byla při měření navíc použita kolizní cela s průtokem helia.

Podmínky měření metodou HG-CT ve spojení s ICP-MS, které byly při analýze použity, jsou shrnuty v tabulce 3.1.

V tabulce 3.2 je znázorněn proces ISIS programu při měření metodou HG-CT-ICP-MS.

Tab. 3.1: Použité podmínky měření při analýze HG-CT-ICP-MS.

ICP-MS	Agilent 7700x
Výkon, W	1600
Průtok zmlžovače Ar, L min ⁻¹	0,6
Průtok ředícího plynu Ar, L min ⁻¹	0,5
Zmlžovací pumpa, rps	0,1
Průtok vnitřního standardu, mL min ⁻¹	0,3
Vnitřní standard	Te 100 ng mL ⁻¹ v 0,2% HNO ₃
Průtok kolizního plynu He, mL min ⁻¹	3,5
Dávkovaný objem vzorku, µL	350
Průtok činidel, mL min ⁻¹	1
Průtok nosného plynu, He, mL min ⁻¹	75

Tab. 3.2: ISIS program pro metodu HG-CT-ICP-MS.

Krok	Popis činnosti	Doba trvání, s	Pumpa 1, rps	Pumpa 2, rps	Ohřev	Solenoidový ventil
1	chlazení	30	0	0,65	vypnutý	otevřený
2	generování	55	0,25	0	vypnutý	otevřený
3	prodleva pro záchyt	70	0	0	vypnutý	otevřený
4	prodleva před měřením	10	0	0	vypnutý	zavřený
5	měření	36	0	0	zapnutý	zavřený
6	měření	1	0	0	vypnutý	zavřený
7	měření	22	0	0	zapnutý	zavřený
8	čištění U-trubice	35	0	0,65	zapnutý	zavřený
9	čištění HG	50	0	0,65	vypnutý	otevřený
10	konec	1	0	0	vypnutý	otevřený

3.8 Zpracování dat

Signály detektoru byly ukládány a zpracovány prostřednictvím programu MassHunter Workstation od Agilent Technologies. V tomto programu byly provedeny integrace veškerých naměřených dat a výpočty koncentrací. Tato získaná data byla dále exportována a zpracována v programu MS Excel. Vyhodnocovány byly plochy píků jednotlivých specií. Byla provedena dvě měření standardů a slepých vzorků a dvě až tři měření dvou nebo tří paralelně připravených vzorků pro extrakce.

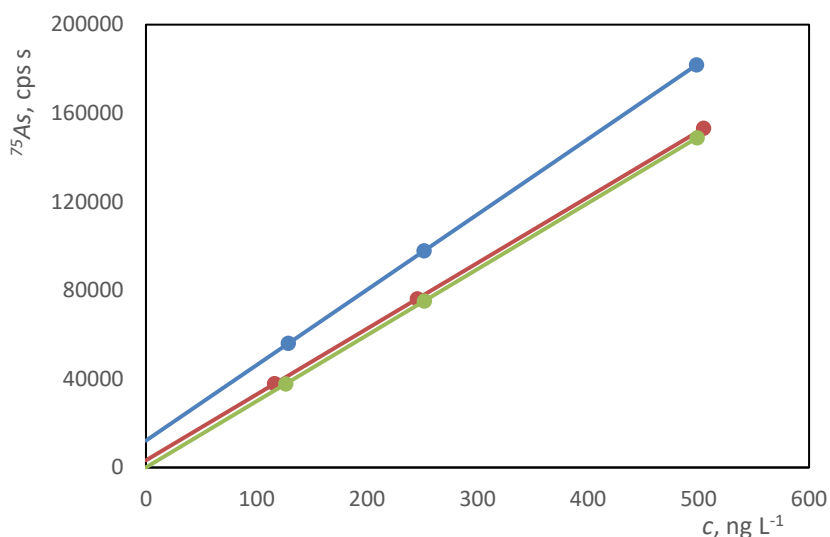
Koncentrace specií jsou vyjadřovány v přepočtu na arsen.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

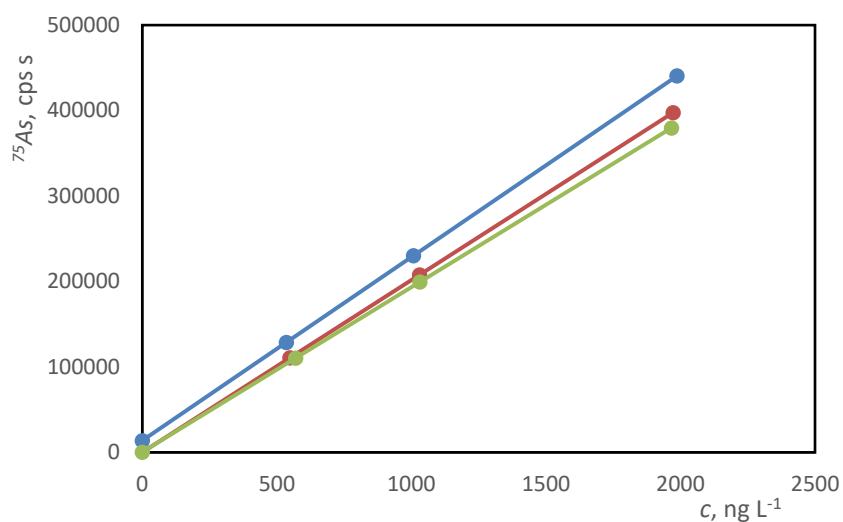
4.1 Analytické parametry metody

Používaný analytický systém HG-CT-ICP-MS byl zkonstruován na Ústavu analytické chemie AV ČR. Pro potřeby této práce byla část systému HG-CT přizpůsobena pro ISIS modul, který byl spojen s ICP-MS spektrometrem. Signály jednotlivých arsanů, které byly detekovány pomocí ICP-MS, byly zaznamenány ve formě chromatogramů. Po každé proběhnuté analýze byly zachyceny tři chromatografické píky, přičemž první pík příslušel arsanu, druhý pík methylarsanu a třetí pík dimethylarsanu. Vzorový graf signálu je zobrazen v bakalářské práci²³. V mnoha případech byl na chromatogramu viděn i čtvrtý pík, který patřil trimethylarsanu, ten ovšem nebyl kvantifikován, jelikož během preredukce L-cysteinem docházelo k jeho ztrátám a jeho obsahy ve vzorcích referenčních materiálů byly zanedbatelné. Dávkovací špička byla připojena k systému, kam byl následně pipetován vzorek. Před každým měřením standardu nebo vzorku byla promyta deionizovanou vodou a mezi měřením jednotlivých vzorků extraktů byl proměřen slepý vzorek. Kalibrační standardy byly měřeny před analýzou samotných vzorků extraktů. Citlivost stanovení byla průběžně kontrolována proměřováním standardů mezi vzorky.

Kalibrační grafy byly sestaveny pomocí kalibračního slepého vzorku a směsných standardů o koncentracích specií 125 ng L⁻¹, 250 ng L⁻¹ a 500 ng L⁻¹ As nebo o koncentracích specií 500 ng L⁻¹, 1000 ng L⁻¹ a 2000 ng L⁻¹ As dle obsahu specií v extraktech jednotlivých CRM. Kalibrační grafy pro jednotlivé specie jsou znázorněny na obrázku 4.1a a 4.1b.



Obr. 4.1a: Kalibrační graf závislosti ploch píků pro specie : A – iAs^{III}, B – MAs^V a C - DMAs^V na koncentraci jednotlivých standardů – 125 ng L⁻¹, 250 ng L⁻¹ a 500 ng L⁻¹ As.



Obr. 4.1b: Kalibrační graf závislosti ploch píků pro specie A – iAs^{III}, B – MAs^V a C – DMAs^V na koncentraci jednotlivých standardů – 500 ng L⁻¹, 1000 ng L⁻¹ a 2000 ng L⁻¹ As.

V obou kalibračních grafech byly znázorněny závislosti měření ploch píků pro jednotlivé specie na koncentraci použitých standardů. Kalibrační závislosti jsou lineární, směrnice přímků jednotlivých specií se lišily o méně než 13 %, takže citlivost stanovení byla téměř stejná pro všechny specie.

Relativní směrodatná odchylka na koncentrační úrovni 125 ng L⁻¹ až 500 ng L⁻¹ vycházela méně než 3 % a na koncentrační úrovni 500 ng L⁻¹ až 2000 ng L⁻¹ byla méně než 5 %.

Byly proměřeny extrakční slepé vzorky, díky kterým bylo možné vypočítat meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ). Meze detekce byly spočítány jako koncentrace trojnásobku směrodatné odchylky těchto slepých vzorků a mez stanovitelnosti (LOQ) jako koncentrace desetinásobku směrodatných odchylek slepých vzorků. Jejich vypočítané hodnoty jsou znázorněny v tabulce 4.1. Hodnoty jsou přepočteny na obsahy specií arsenu v původním vzorku.

Tab. 4.1: Hodnoty meze detekce a meze stanovitelnosti pro jednotlivé specie.

jednotlivé specie	LOD, ng g ⁻¹	LOQ, ng g ⁻¹
iAs	9	29
MAs	1	3
DMAs	2	6

4.2 Potvrzení procesu demethylace v přítomnosti peroxidu vodíku

Použitá extrakční procedura vycházela z publikace Pétursdóttir et al²⁴. Experimenty zkoumající účinnost extrakce byly popsány v bakalářské práci. V této práci byly zjištěny významné rozdíly výsledků měření celkového obsahu i zastoupení jednotlivých specií při použití peroxidu vodíku a bez něj. Primárně byl zkoumán vliv (interference) peroxidu vodíku při extrakci a při samotné analýze.

Bakalářská práce²³ byla uzavřena předpokladem, že nejspíše docházelo k rozkladu methylovaných specií a bylo tak dosahováno zdánlivě vyššího obsahu anorganického arsenu. Byla tedy provedena extrakce vzorků materiálu DORM-3 pomocí extrakčního činidla 2% kyseliny dusičné a poté i s 2% kyselinou dusičnou s pomocným činidlem 3% peroxidem vodíku. Přidáváním standardů 50 µl MAs a DMAs o koncentraci 100 µg L⁻¹ byla potvrzena demethylace. Tyto přídavky byly do vzorků přidány dvěma způsoby. Prvním způsobem byly standardy přidány před extrakcí, byly tedy se vzorky společně extrahovány v UltraWave zařízení a následně upraveny a analyzovány. Druhým způsobem byly přídavky standardů přidány až před redukcí L-cysteinem před samotným měřením. Výsledky obou způsobů přídavků jsou shrnuty v tabulce 4.2.

Tab. 4.2: Extrakce vzorku DORM-3 se standardními přídávky MAs a DMAs před extrakcí a po extrakci

Extrakce UltraWave	Standardní přídavek MAs / DMAs		Speciace
2% HNO ₃	<i>před extrakcí</i>		specie se nepřeměňují
2% HNO ₃		<i>po extrakci</i>	specie se nepřeměňují
2% HNO ₃ + 3% H ₂ O ₂	<i>před extrakcí</i>		specie se nepřeměňují
2% HNO ₃ + 3% H ₂ O ₂		<i>po extrakci</i>	specie se nepřeměňují
DORM-3 + 2% HNO ₃	<i>před extrakcí</i>		specie se nepřeměňují
DORM-3 + 2% HNO ₃		<i>po extrakci</i>	specie se nepřeměňují
DORM-3 + 2% HNO ₃ + 3% H ₂ O ₂	<i>před extrakcí</i>		probíhá demethylace
DORM-3 + 2% HNO ₃ + 3% H ₂ O ₂		<i>po extrakci</i>	probíhá demethylace

Ze získaných informací je vidno, že demethylace proběhla, a to až v procesu generování, nikoli během extrakce. Tento jev byl způsoben přítomností peroxidu vodíku, jakožto pomocného extrakčního činidla v kombinaci s danou matricí. Během měření v přítomnosti peroxidu vodíku byla zaregistrována nižší citlivost stanovení. V přítomnosti matrice a peroxidu vodíku probíhala demethylace a velké zvýšení koncentrace anorganického arsenu. Měření vzorků bez peroxidu vodíku způsobovalo pouze nižší hodnoty výsledků. V dalším kroku bylo tedy potřeba peroxid vodíku v roztoku rozložit. Tento výsledek je poměrně zajímavý, protože demethylace spojená se štěpením vazby As-C byla dosud popsána jen v několika málo pracích⁵¹. Demethylace arsenu v prostředí Tris-HCl pufru s L-cysteinem nebyla pozorována.

4.2.1 Rozklad peroxidu vodíku v roztoku

Pro rozklad peroxidu vodíku byl použit enzym kataláza, který jej dokáže velmi účinně a rychle rozštěpit na vodu a kyslík. Pro ověření účinku katalázy byla provedena manganometrická titrace, která je podrobně popsána v kapitole 3.5.

V tabulce 4.3 jsou zobrazeny spotřeby při titraci manganistanem draselným o koncentraci 0,1843 mol L⁻¹.

Tab. 4.3: Podmínky průběhu titrace a spotřeby titračního činidla.

č. titrace	$V_{(\text{extrakt})}$ [ml]	neutralizace	kataláza	$V_{(\text{H}_2\text{SO}_4)}$ [ml]	$V_{(\text{KMnO}_4)}$ [ml]
1	1	ano	ano	4	0,1
2	1	ano	ano	4	0,1
3	1	ano	ano	4	0,1

Spotřeby manganistanu draselného, které jsou zobrazeny v tabulce 4.3 jsou nominálně stejné pro zředěný i nezředěný extrakt. Pro ztitrování peroxidu vodíku v roztoku stačilo pouze 0,1 ml manganistanu draselného, tímto bylo ověřeno, že nezůstal žádný peroxid vodíku v roztoku. Jediným rozdílem byl větší přídavek 2,5% hydroxidu amonného do nezředěného extraktu k neutralizaci roztoku.

Bylo zjištěno, že neutralizace roztoku před titrací, a poté tedy i před samotným měřením, je nutné. Bez přidání 2,5% roztoku hydroxidu amonného v prostředí 2% kyseliny dusičné není kataláza účinná a nedochází k rozkladu peroxidu vodíku, tudíž jsou vysoké spotřeby manganistanu draselného.

Byla také zjištěna zbytková koncentrace peroxidu vodíku, který zůstal v nezneutralizovaném roztoku. Z průměru tří titrací bylo vypočítáno, že v 1 ml extraktu bylo přítomno ještě 1,95% peroxidu vodíku.

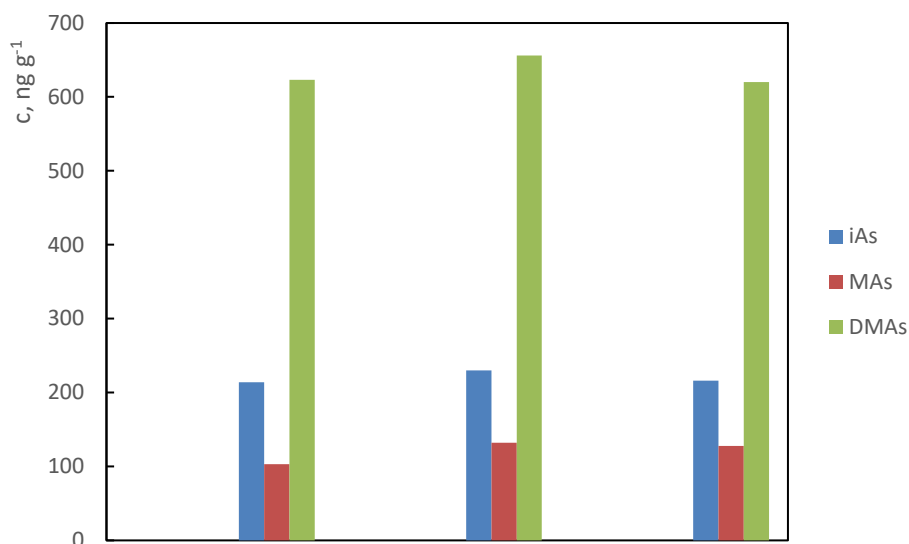
4.3 Analýza CRM po mikrovlnné extrakci

Extrakce v mikrovlnném zařízení v 2% kyselině dusičné s 3% peroxidem vodíku byla provedena pro vzorky materiálu DORM-4, TORT-3, ERM-CE278k, DOLT-4, DORM-3, DOLT-5, PRON-1 a SQID-1. Následně proběhla analýza HG-CT-ICP-MS a bylo vyhodnoceno zastoupení jednotlivých specií arsenu pro různé druhy matric. Byla prováděna dvě měření vždy dvou až tří paralelně připravených vzorků.

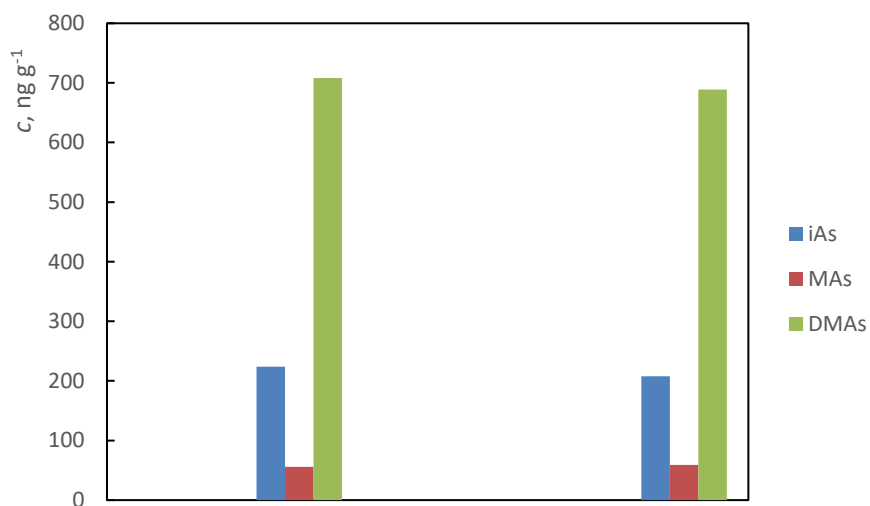
Pro jednotlivé matrice DOLT-5, ERM-CE278k, PRON-1 a SQID-1 byla provedena stanovení s dvěma různými standardními přídávky iAs^{III} , MAs^{V} a DMAs^{V} .

Přídavky standardů se pro jednotlivé materiály lišily dle koncentrace jejich specií a jejich kalibrační křivky. Pro materiály DOLT-5 a ERM-CE278k bylo přidáváno 15 μl 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ iAs^{III} , MAs^{V} , DMAs^{V} (600 ng L^{-1} / 2,5 ml vzorku) a 30 μl 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ iAs^{III} , MAs^{V} a DMAs^{V} (1200 ng L^{-1} / 2,5 ml vzorku).

4.3.1 Analýza referenčního materiálu DORM-3 a DORM-4



Obr. 4.2: Zastoupení jednotlivých specií arsenu (iAs, MAs, DMAs) pro tři paralelní extrakce v materiálu DORM-3.



Obr. 4.3: Zastoupení jednotlivých specií arsenu pro dvě paralelní extrakce v materiálu DORM-4.

Analýza referenčního materiálu DORM-4 byla provedena bez přidavku standardů. Byla provedena celkem dvě měření dvou paralelně připravených vzorků.

V tabulce 4.4 a 4.5 jsou znázorněny vypočítané výsledky pro materiál DORM-3 a DORM-4 pro jednotlivé specie arsenu po analýze metodou HG-CT-ICP-MS, výsledky Dr. Karla Marschnera pro tento materiál metodou HPLC-HG-AFS a některé publikované hodnoty pro porovnání.

Tab. 4.4: Koncentrační zastoupení jednotlivých specií arsenu pro materiál DORM-3 metodou HG-CT-ICP-MS, metodou HPLC-HG-AFS a publikované hodnoty.

DORM-3				
Metoda	iAs, $\mu\text{g kg}^{-1}$	MAs, $\mu\text{g kg}^{-1}$	DMAs, $\mu\text{g kg}^{-1}$	citace
HG-CT-ICP-MS	226 ± 8	119 ± 14	522 ± 14	-
HPLC-HG-AFS	239 ± 34	68 ± 11	480 ± 6	(cit. ⁵⁸)
LC-HG-ICP-MS	160 ± 10	-	-	(cit. ²⁴)
SPE HG-AAS	190 ± 10	-	-	(cit. ⁵²)
CE-ICP-MS	1400 ± 40	400 ± 10	540 ± 20	(cit. ²⁰)
CE-ICP-MS	320 ± 20	450 ± 60	430 ± 10	(cit. ⁵⁴)

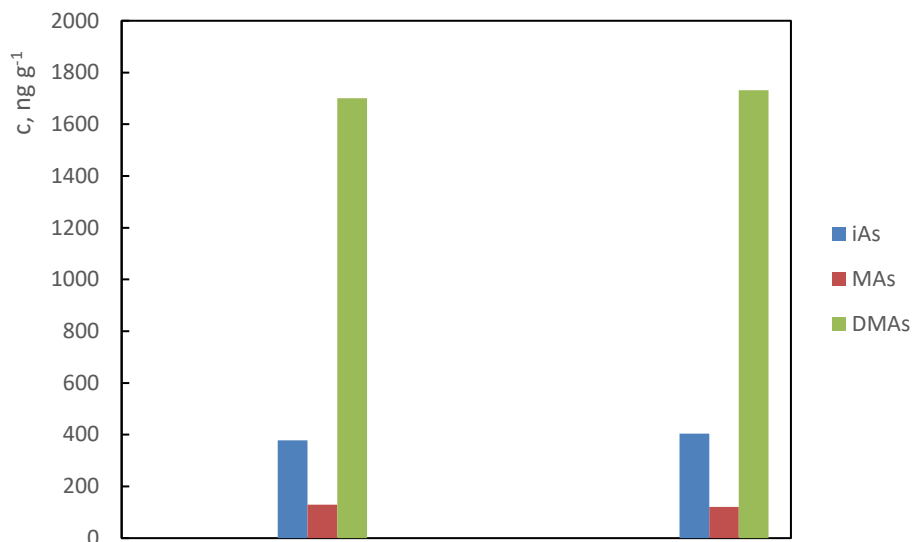
Tab. 4.5: Koncentrační zastoupení jednotlivých specií arsenu pro materiál DORM-4 metodou HG-CT-ICP-MS, metodou HPLC-HG-AFS a publikované hodnoty.

DORM-4				
Metoda	iAs, $\mu\text{g kg}^{-1}$	MAs, $\mu\text{g kg}^{-1}$	DMAs, $\mu\text{g kg}^{-1}$	citace
HG-CT-ICP-MS	219 ± 9	57 ± 5	700 ± 18	-
HPLC-HG-AFS	205 ± 10	37 ± 3	586 ± 14	(cit. ⁵⁸)
LC-ICP-MS	214 ± 18	43 ± 4,5	541 ± 55	(cit. ⁵⁶)

Z těchto výsledných hodnot můžeme vidět, že v případě materiálu DORM-3 se publikované hodnoty měřené různými metodami mezi sebou velmi liší. V případě porovnání výsledků metodou HG-CT-ICP-MS v porovnání s výsledky Dr. Karla Marschnera se výsledky liší nepatrně.

Výsledné hodnoty pro materiál DORM-4 se s publikovanými hodnotami shodují.

4.3.2 Analýza referenčního materiálu TORT-3



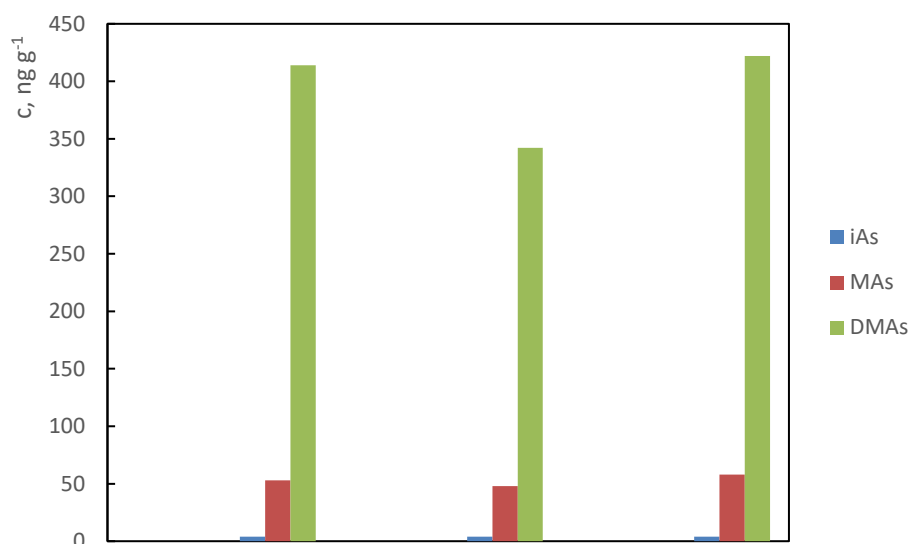
Obr. 4.4: Zastoupení jednotlivých specií arsenu pro dvě paralelní extrakce v materiálu TORT-3.

Specie arsenu byly v referenčním materiálu TORT-3 taktéž stanovovány pouze metodou bez přidavků standardů. Byla prováděna dvě měření dvou paralelně připravených vzorků. V tabulce 4.5 jsou zobrazeny vypočítané výsledky specií iAs, MAs a DMAs, výsledky Dr. Karla Marschnera a některé publikované hodnoty pro porovnání.

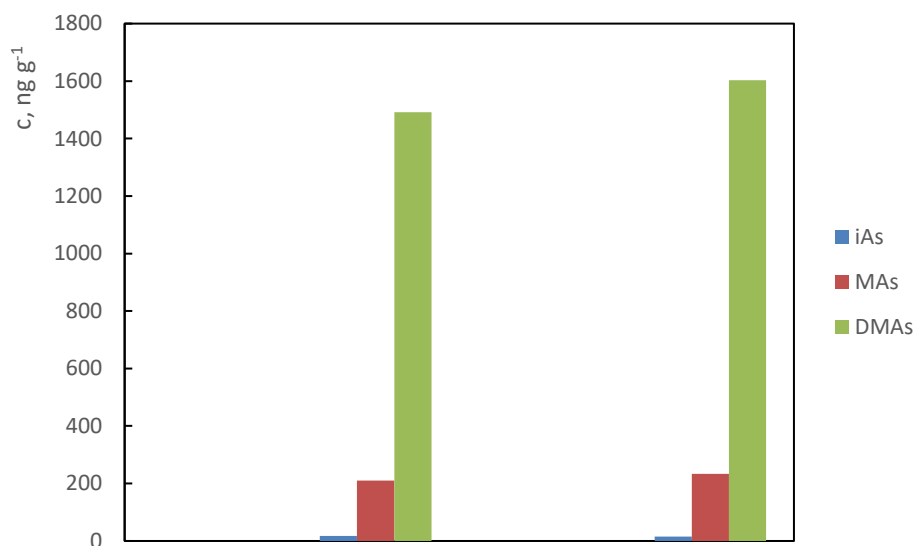
Tab. 4.6: Koncentrace jednotlivých specií arsenu v materiálu TORT-3 metodou HG-CT-ICP-MS, metodou HPLC-HG-AFS a publikované hodnoty.

TORT-3				
Metoda	iAs, $\mu\text{g kg}^{-1}$	MAs, $\mu\text{g kg}^{-1}$	DMAs, $\mu\text{g kg}^{-1}$	citace
HG-CT-ICP-MS	383 ± 9	126 ± 8	1696 ± 21	-
HPLC-HG-AFS	428 ± 6	212 ± 18	1617 ± 72	(cit. ⁵⁸)
HPLC-ICP-MS	341 ± 30	125 ± 39	1303 ± 67	(cit. ⁵⁶)

4.3.3 Analýza referenčních materiálů DOLT-4 a DOLT-5



Obr. 4.5: Zastoupení jednotlivých specií arsenu pro tři paralelní extrakce v materiálu DOLT-4.

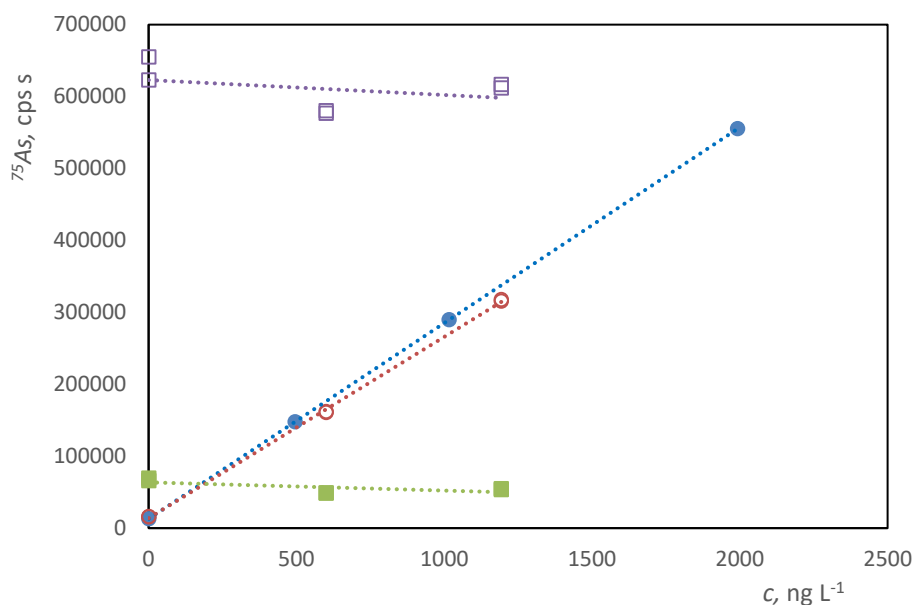


Obr. 4.6: Zastoupení jednotlivých specií arsenu pro dvě paralelní extrakce v materiálu DOLT-5.

Referenční materiál DOLT-4 byl stanoven též metodou bez přidavku standardů a byla prováděna dvě měření tří paralelně připravených vzorků.

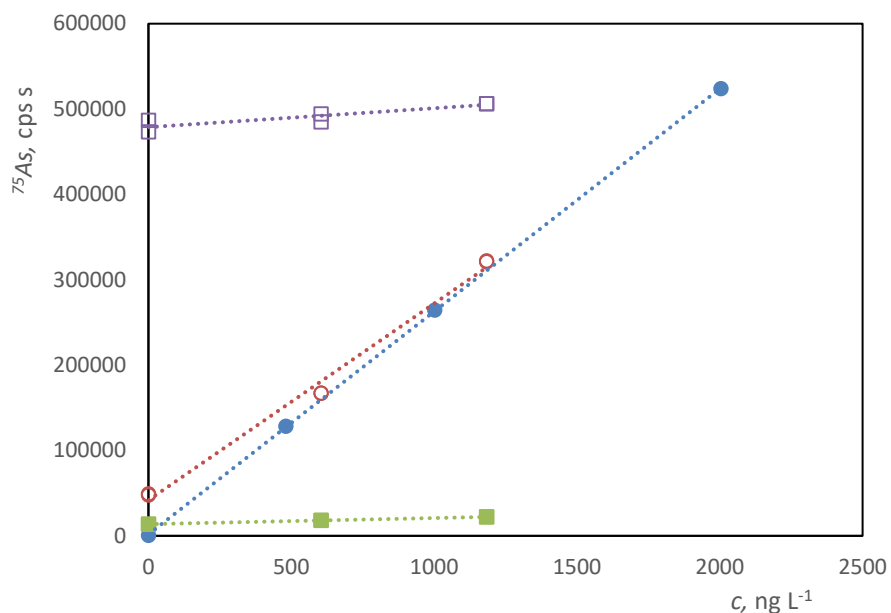
V tabulce 4.7 jsou vypočítané koncentrace jednotlivých specií arsenu metodou HG-CT-ICP-MS, výsledky dr. Marschnera získané metodou HPLC-HG-AFS a některé publikované hodnoty pro porovnání.

Referenční materiál DOLT-5 byl pro ověření stanoven i se standardními přídávky iAs, MAs a DMAs, které byly přidány k extraktům před analýzou. Byla prováděna dvě měření dvou paralelně připravených vzorků. Dle grafů na obr. 4.7, 4.8 a 4.9 je patrné, že nedocházelo k demethylaci methylovaných specií. V každém grafu jsou znázorněny i závislosti ostatních specií, jejichž standardy nebyly přidány jako důkaz toho, že opravdu nedochází k demethylaci. U všech specií se směrnice přímků s přídávky standardů dobře shoduje se směrnici kalibrační přímkou, takže v matici extraktu nedochází k interferenci.



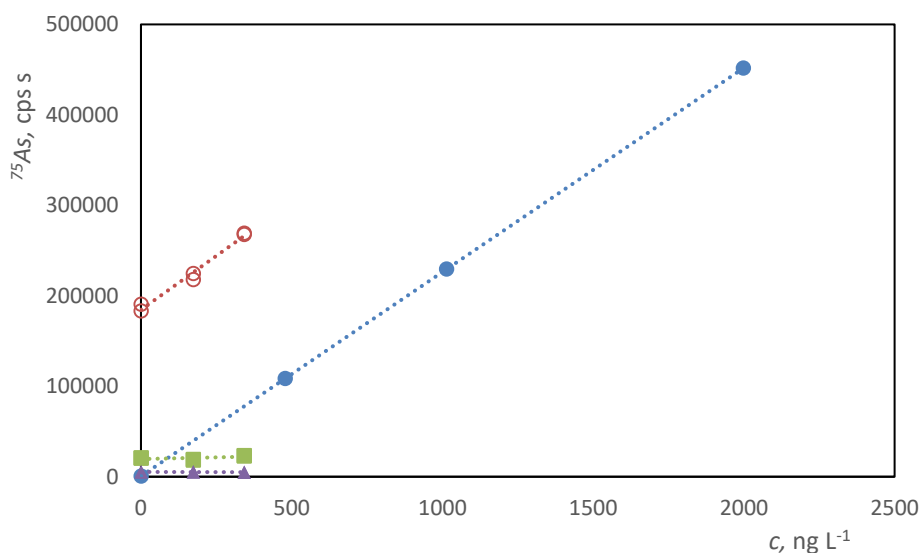
Obr. 4.7: Graf závislosti ploch píků pro specii iAs na koncentraci standardních přídávků iAs pro materiál DOLT-5.

- – kalibrační graf závislosti ploch píků specie iAs na koncentraci jednotlivých standardů v 0,2% HNO₃.
- – závislost ploch píků iAs na koncentraci standardních přídávků iAs v matici extraktu DOLT-5.
- – závislost ploch píků MAs na koncentraci standardních přídávků iAs v matici extraktu DOLT-5.
- – závislost ploch píků DMAs na koncentraci standardních přídávků iAs v matici extraktu DOLT-5.



Obr. 4.8: Graf závislosti ploch píků pro specii MAs na koncentraci standardních přídavků MAs pro materiál DOLT-5.

- – kalibrační graf závislosti ploch píků specie MAs na koncentraci jednotlivých standardů v 0,2% HNO_3 .
- – závislost ploch píků MAs na koncentraci standardních přídavků MAs v matrici DOLT-5.
- – závislost ploch píků iAs na koncentraci standardních přídavků MAs v matrici DOLT-5.
- – závislost ploch píků DMAs na koncentraci standardních přídavků MAs v matrici DOLT-5.



Obr. 4.9: Graf závislosti ploch píků pro specii DMAs na koncentraci standardních přídavek DMAs pro materiál DOLT-5.

- – kalibrační graf závislosti ploch píků specie DMAs na koncentraci jednotlivých standardů v 0,2% HNO₃.
- – závislost ploch píků DMAs na koncentraci standardních přídavek DMAs v matrici DOLT-5.
- – závislost ploch píků MAs na koncentraci standardních přídavek DMAs v matrici DOLT-5.
- ▲ – závislost ploch píků iAs na koncentraci standardních přídavek DMAs v matrici DOLT-5.

V tabulce 4.7 a 4.8 jsou zobrazeny výsledné koncentrace jednotlivých specií pro materiály DOLT-4 a DOLT-5 měřené metodou HG-GT-ICP-MS, výsledky Dr. Marschnera metodou HPLC-HG-AFS a některé publikované výsledky pro porovnání.

Tab. 4.7: Koncentrační zastoupení jednotlivých specií arsenu v materiálu DOLT-4 metodou HG-CT-ICP-MS, metodou HPLC-HG-AFS a publikované hodnoty pro porovnání.

DOLT-4				
Metoda	iAs, $\mu\text{g kg}^{-1}$	MAs, $\mu\text{g kg}^{-1}$	DMAs, $\mu\text{g kg}^{-1}$	Citace
HG-CT-ICP-MS	2 - 8	71 ± 5	556 ± 14	-
HPLC-HG-AFS	25 ± 4	88 ± 12	531 ± 27	(cit. ⁵⁸)
HPLC-ICP-MS	17 ± 0,3	-	-	(cit. ²⁴)
LC-ICP-MS	20 ± 3	100 ± 2	450 ± 70	(cit. ⁵³)

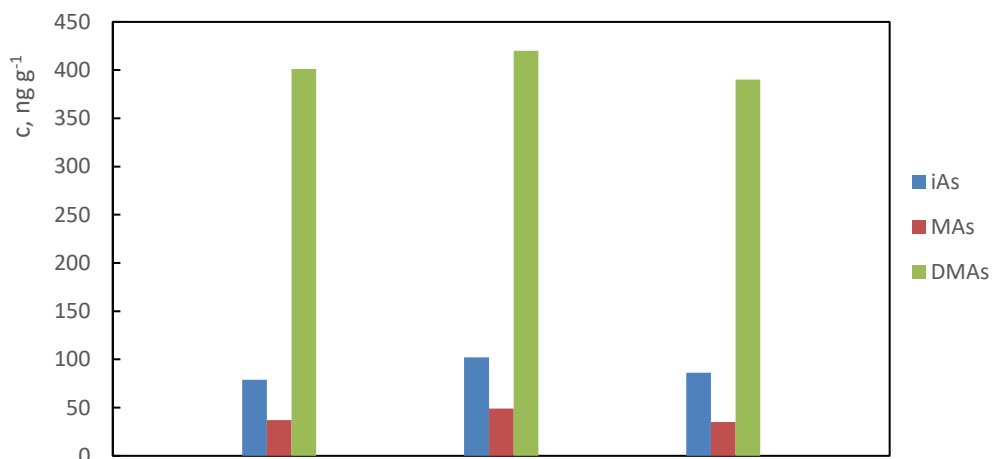
Tab. 4.8: Koncentrační zastoupení jednotlivých specií arsenu v materiálu DOLT-5 metodou HG-CT-ICP-MS a metodou HPLC-HG-AFS.

DOLT-5				
Metoda	iAs, $\mu\text{g kg}^{-1}$	MAs, $\mu\text{g kg}^{-1}$	DMAs, $\mu\text{g kg}^{-1}$	citace
HG-CT-ICP-MS	16 ± 1	254 ± 3	2049 ± 27	-
HPLC-HG-AFS	29 ± 7	155 ± 32	1742 ± 45	(cit. ⁵⁸)

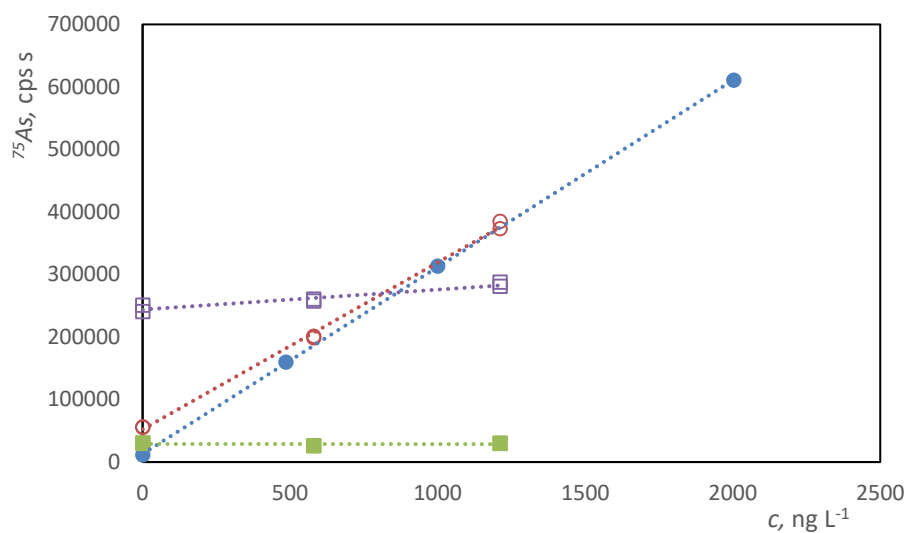
Výsledky hodnot pro materiál DOLT-4 a DOLT-5 jsou srovnatelné s přihlédnutím k nízkým hodnotám obsahu iAs. Nebyly nalezeny žádné publikované hodnoty pro referenční materiál DOLT-5.

Specie arsenu je velmi obtížné v této matici stanovit, což dokazuje například špatná shoda publikovaných výsledků v práci Zmozinski et al⁵³.

4.3.4 Analýza referenčního materiálu ERM-CE278k

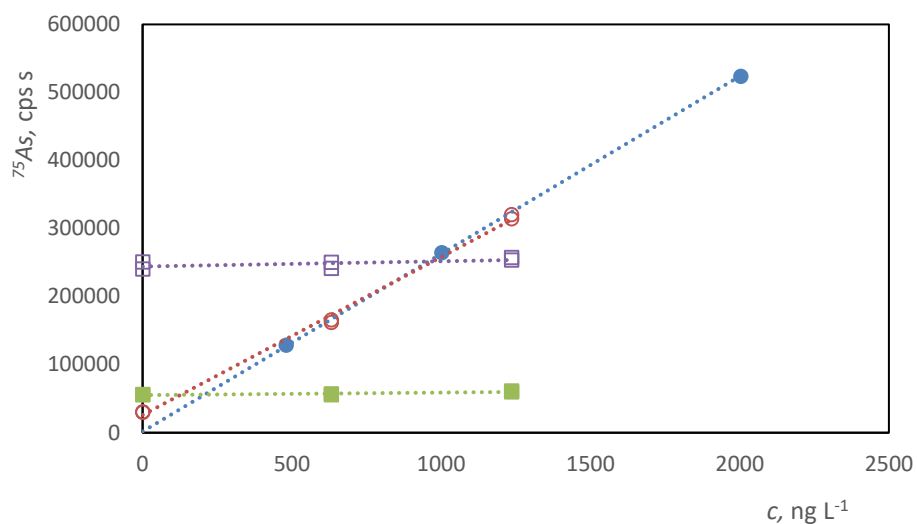


Obr. 4.10: Zastoupení jednotlivých specií arsenu pro tři paralelní extrakce v materiálu ERM-CE278k.



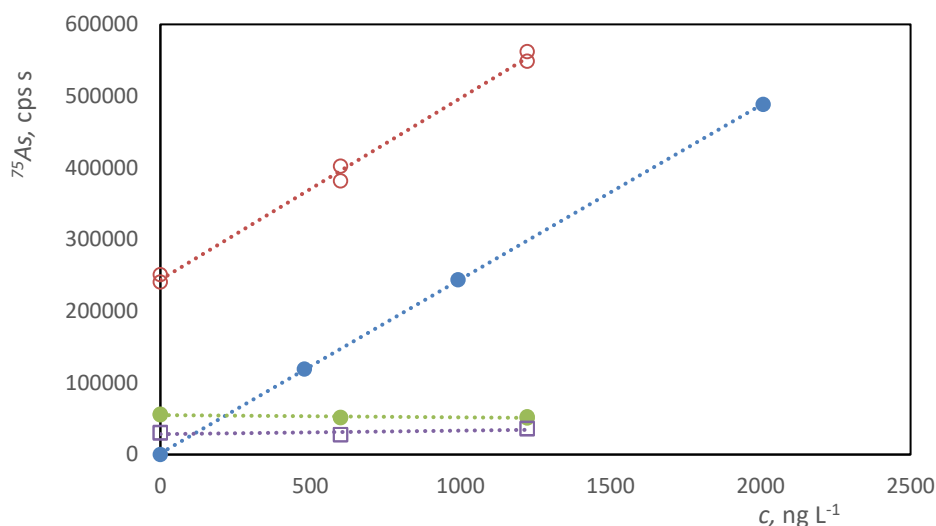
Obr. 4.11: Graf závislosti ploch píků pro specii iAs na koncentraci standardních přídávků iAs pro materiál ERM-CE278k.

- – kalibrační graf závislosti ploch píků specie iAs na koncentraci jednotlivých standardů v 0,2% HNO₃.
- – závislost ploch píků iAs na koncentraci standardních přídávků iAs v matrici ERM-CE278k.
- – závislost ploch píků MAs na koncentraci standardních přídávků iAs v matrici ERM-CE278k.
- – závislost ploch píků DMAs na koncentraci standardních přídávků iAs v matrici ERM-CE278k.



Obr. 4.12: Graf závislosti ploch píků pro specii MAs na koncentraci standardních přídavek MAs pro materiál ERM-CE278k.

- – kalibrační graf závislosti ploch píků specie MAs na koncentraci jednotlivých standardů v 0,2% HNO_3 .
- – závislost ploch píků MAs na koncentraci standardních přídavek MAs v matrici ERM-CE278k.
- – závislost ploch píků iAs na koncentraci standardních přídavek MAs v matrici ERM-CE278k.
- – závislost ploch píků DMAs na koncentraci standardních přídavek MAs v matrici ERM-CE278k.



Obr. 4.13: Graf závislosti ploch píků pro specii DMAs na koncentraci standardních přídávků DMAs pro materiál ERM-CE278k.

- – kalibrační graf závislosti ploch píků specie DMAs na koncentraci jednotlivých standardů v 0,2% HNO₃.
- – závislost ploch píků DMAs na koncentraci standardních přídávků DMAs v matrici ERM-CE278k.
- – závislost ploch píků iAs na koncentraci standardních přídávků DMAs v matrici ERM-CE278k.
- – závislost ploch píků MAs na koncentraci standardních přídávků DMAs v matrici ERM-CE278k.

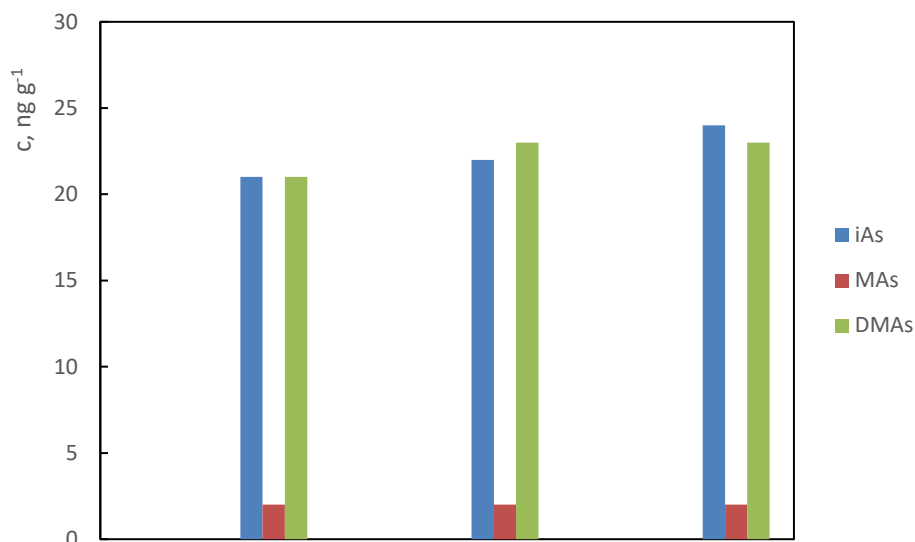
Referenční materiál ERM-CE278k byl také stanovován se standardními přídávky i bez nich, přičemž byla prováděna dvě měření tří paralelně připravených vzorků. Z grafů je vidno, že během měření nedocházelo k demethylaci. Vypočítané koncentrace jednotlivých specií pro materiál ERM-CE278k jsou znázorněny v tabulce 4.9.

Tab. 4.9: Koncentrační zastoupení jednotlivých specií pro materiál ERM-CE278k metodou HG-CT-ICP-MS, metodou HPLC-HG-AFS a publikované hodnoty pro porovnání.

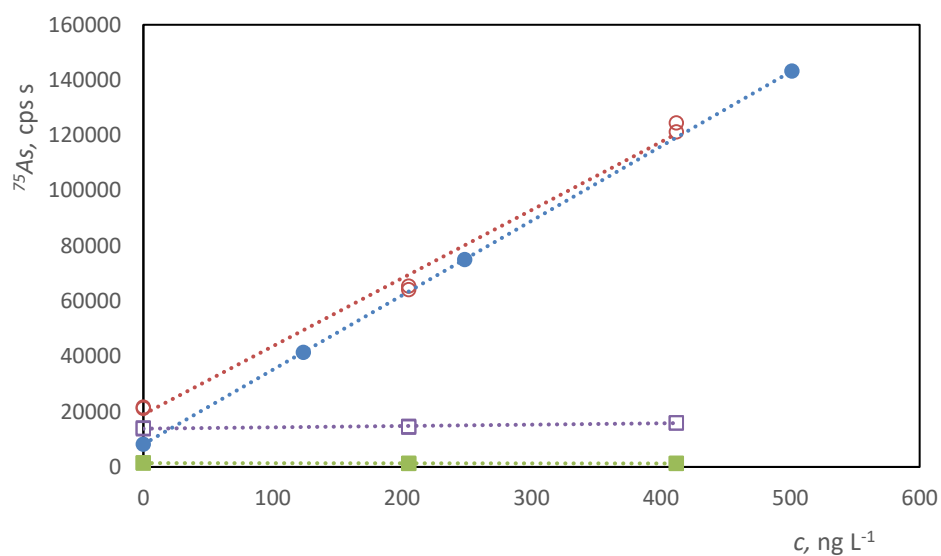
ERM-CE278k				
Metoda	iAs, $\mu\text{g kg}^{-1}$	MAs, $\mu\text{g kg}^{-1}$	DMAs, $\mu\text{g kg}^{-1}$	citace
HG-CT-ICP-MS	84 ± 13	84 ± 7	463 ± 14	-
HPLC-HG-AFS	79 ± 4	53 ± 14	380 ± 40	(cit. ⁵⁸)
LC-ICP-MS	70 ± 3	100 ± 2	620 ± 40	(cit. ⁵³)

Výsledky měření tohoto referenčního materiálu jsou pro specii iAs v dobré shodě s publikovanými hodnotami, v případě methylovaných specií je to obdobný případ jako u DOLT-4 a DOLT-5. Obsahy specií v této matrici jsou dosti nízké.

4.3.5 Analýza referenčního materiálu PRON-1

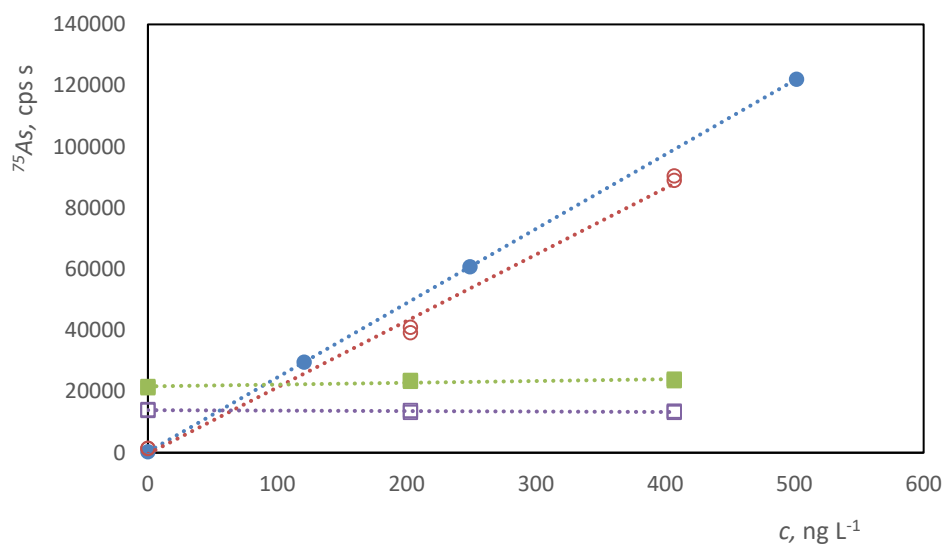


Obr. 4.14: Zastoupení jednotlivých specií arsenu pro tři paralelní extrakce v materiálu PRON-1.



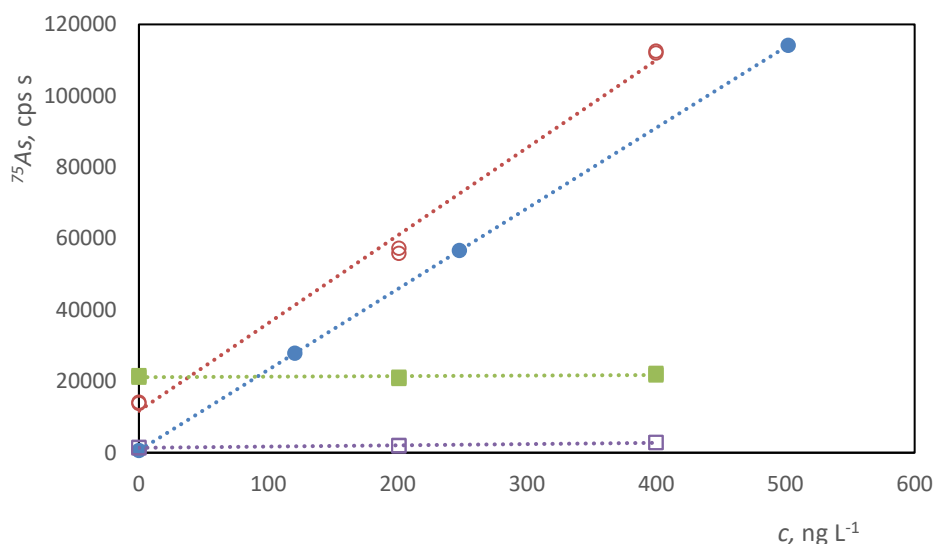
Obr. 4.15: Graf závislosti ploch píků pro specii iAs na koncentraci standardních přídavků iAs pro materiál PRON-1.

- – kalibrační graf závislosti ploch píků specie iAs na koncentraci jednotlivých standardů v 0,2% HNO₃.
- – závislost ploch píků iAs na koncentraci standardních přídavků iAs v matrici PRON-1.
- – závislost ploch píků MAs na koncentraci standardních přídavků iAs v matrici PRON-1.
- – závislost ploch píků DMAs na koncentraci standardních přídavků iAs v matrici PRON-1.



Obr. 4.16: Graf závislosti ploch píků pro specii MAs na koncentraci standardních přídavků MAs pro materiál PRON-1.

- – kalibrační graf závislosti ploch píků specie MAs na koncentraci jednotlivých standardů v 0,2% HNO₃.
- – závislost ploch píků MAs na koncentraci standardních přídavků MAs v matrici PRON-1.
- – závislost ploch píků iAs na koncentraci standardních přídavků MAs v matrici PRON-1.
- – závislost ploch píků DMAs na koncentraci standardních přídavků MAs v matrici PRON-1.



Obr. 4.17: Graf závislosti ploch píků pro specii DMAs na koncentraci standardních přídavek DMAs pro materiál PRON-1.

- – kalibrační graf závislosti ploch píků specie DMAs na koncentraci jednotlivých standardů v 0,2% HNO₃.
- – závislost ploch píků DMAs na koncentraci standardních přídavek DMAs v matrici PRON-1.
- – závislost ploch píků iAs na koncentraci standardních přídavek DMAs v matrici PRON-1.
- – závislost ploch píků MAS na koncentraci standardních přídavek DMAs v matrici PRON-1.

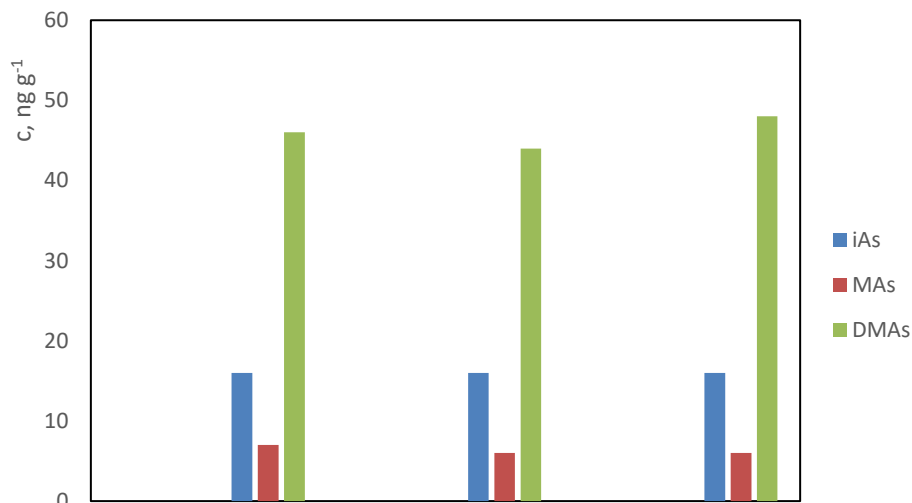
Stanovení koncentrace jednotlivých specií arsenu pro materiál PRON-1 bylo taktéž prováděno se standardními přídávky pro ověření, že dané specie nepodléhají demethylaci. Byla prováděna dvě měření tří paralelně připravených vzorků. Výsledné koncentrace vypočítané pro jednotlivé specie metodou HG-CT-ICP-MS a metodou HPLC-HG-AFS jsou znázorněny v tabulce 4.10.

Tab. 4.10: Koncentrace jednotlivých specií arsenu pro materiál PRON-1 metodou HG-CT-ICP-MS a metodou HPLC-HG-AFS.

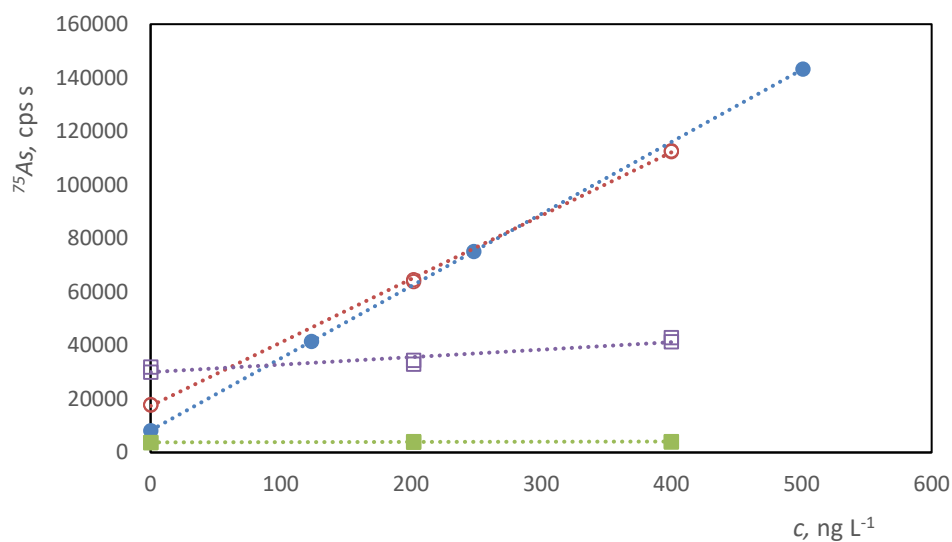
PRON-1				
Metoda	iAs, $\mu\text{g kg}^{-1}$	MAs, $\mu\text{g kg}^{-1}$	DMAs, $\mu\text{g kg}^{-1}$	citace
HG-CT-ICP-MS	22 ± 1	$2 \pm 0,1$	26 ± 2	-
HPLC-HG-AFS	27 ± 4	26 ± 9	42 ± 5	(cit. ⁵⁸)

Další hodnoty specií arsenu nebyly v tomto CRM publikovány, jelikož se jedná o nový referenční materiál.

4.3.6 Analýza referenčního materiálu SQID-1

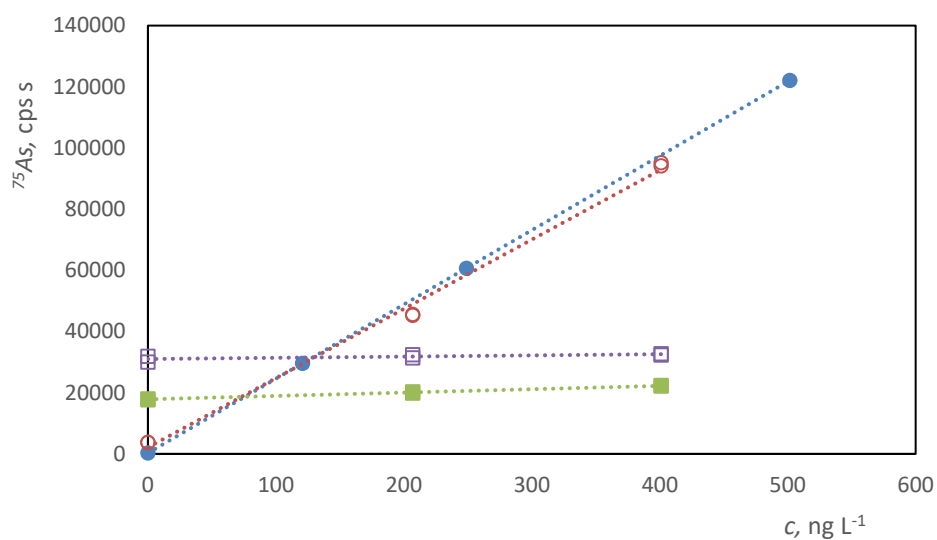


Obr. 4.18: Zastoupení jednotlivých specií arsenu pro tři paralelní extrakce v materiálu SQID-1.



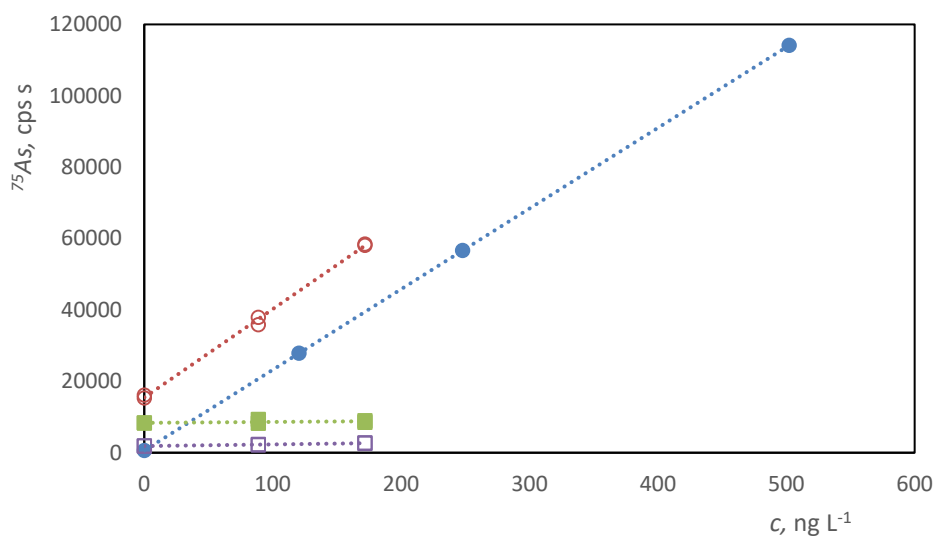
Obr. 4.19: Graf závislosti ploch píků pro specii iAs na koncentraci standardních přídavků iAs pro materiál SQID-1.

- – kalibrační graf závislosti ploch píků specie iAs na koncentraci jednotlivých standardů v 0,2% HNO₃.
- – závislost ploch píků iAs na koncentraci standardních přídavků iAs v matrici SQID-1.
- – závislost ploch píků MAs na koncentraci standardních přídavků iAs matrici SQID-1.
- – závislost ploch píků DMAs na koncentraci standardních přídavků iAs matrici SQID-1.



Obr. 4.20: Graf závislosti ploch píků pro specii MAs na koncentraci standardních přídavků MAs pro materiál SQID-1.

- – kalibrační graf závislosti ploch píků specie MAs na koncentraci jednotlivých standardů v 0,2% HNO_3 .
- – závislost ploch píků MAs na koncentraci standardních přídavků MAs v matrici SQID-1.
- – závislost ploch píků iAs na koncentraci standardních přídavků MAs v matrici SQID-1.
- – závislost ploch píků DMAs na koncentraci standardních přídavků MAs v matrici SQID-1.



Obr. 4.21: Graf závislosti ploch píků pro specii DMAs na koncentraci standardních přídavek DMAs pro materiál SQID-1.

- – kalibrační graf závislosti ploch píků specie DMAs na koncentraci jednotlivých standardů v 0,2% HNO₃.
- – závislost ploch píků DMAs na koncentraci standardních přídavek DMAs v matrici SQID-1.
- – závislost ploch píků iAs na koncentraci standardních přídavek DMAs v matrici SQID-1.
- – závislost ploch píků MAs na koncentraci standardních přídavek DMAs v matrici SQID-1.

Analýza materiálu SQID-1 byla vykonána bez přídavku standardů a pro ověření, že se jednotlivé specie nedemethylují také s přídavky standardů. Byla prováděna dvě měření pro tři paralelně připravené vzorky. Vypočítané výsledky koncentrací pro jednotlivé specie metodou HG-CT-ICP-MS, výsledky získané metodou HPLC-HG-AFS a publikované výsledky jsou zobrazeny v tab. 4.11.

Tab. 4.11: Zastoupení jednotlivých specií arsenu pro materiál SQID-1 metodou HG-CT-ICP-MS, metodou HPLC-HG-AFS a publikované výsledky pro porovnání.

SQID-1				
Metoda	iAs, $\mu\text{g kg}^{-1}$	MAs, $\mu\text{g kg}^{-1}$	DMAs, $\mu\text{g kg}^{-1}$	citace
HG-CT-ICP-MS	16 ± 1	$8 \pm 0,2$	54 ± 2	-
HPLC-HG-AFS	20 ± 4	37 ± 13	77 ± 7	(cit. ⁵⁸)
HPLC-ICP-MS	40 ± 11	-	23 ± 7	(cit. ⁵⁷)

Z těchto grafů bylo možno vidět, že zastoupení jednotlivých specií arsenu se zásadně lišilo, a to podle druhu analyzované matrice. Ke všem vzorkům byla před samotným měřením přidána kataláza, která účinně rozložila peroxid vodíku, takže byly inhibovány jeho nepříznivé vlivy a nedocházelo k demethylaci specií. Methylované specie MAs a DMAs se tedy již nerozkládaly a nedocházelo ke zdánlivě vyššímu obsahu anorganického arsenu.

Hodnoty získané prostřednictvím těchto dvou různých metod jsou ve většině případů srovnatelné. Důvodem některých rozdílných hodnot je složitá matrice a velmi nízké koncentrace u některých vzorků, které je obtížné stanovit.

Výsledky koncentrace pro specií iAs v porovnání s oběma metodami jsou velmi podobné pro všechny referenční materiály. Výsledky analýz specií MAs a DMAs měřené těmito dvěma metodami se od sebe v některých případech významně liší, může to být způsobeno mnoha vlivy, přičemž tím nejzákladnějším je druh použité metody. V případě výsledků, které se pohybují ve velmi nízkých koncentracích, může být způsobena větší chyba analytika. Výsledky jsou zde zobrazeny pro porovnání. Experimentální výsledky ovšem nelze ovlivnit, proto se výsledky v některých případech velmi dobře neshodují.

Při měření některých druhů referenčních materiálů, které obsahovaly velmi nízké koncentrace specií byly zaregistrovány kontaminace, které se projeví extrémně zvýšenými koncentracemi DMAs. Bylo zjištěno, že tento problém byl kvůli kontaminované U-trubice, která tyto falešně zvýšené výsledky DMAs způsobovala.

5. ZÁVĚR

Tato práce byla zaměřena na stanovení různých druhů certifikovaných referenčních materiálů mořského původu. Bylo zjištěno, že v přítomnosti peroxidu vodíku, jakožto pomocného extrakčního činidla, v kombinaci s danou matricí, dochází k procesu demethylace a prováděná paralelní měření udávají neshodné výsledky. Bylo ověřeno, že demethylace probíhá až v procesu generování hydridů, nikoli během extrakce. Pro účinný a rychlý rozklad peroxidu vodíku byl použit enzym kataláza.

Referenční materiály byly stanovovány s přidavky standardů jednotlivých specií arsenu, čímž bylo ověřeno, že nedochází k demethylaci ani k ovlivnění analýzy matricí vzorků. Demethylace methylovaných specií arsenu v průběhu generování hydridů v přítomnosti matrice není běžně pozorována a v budoucnu bude vhodné tento jev dále studovat.

Výsledky měření iAs, MAs a DMAs byly pro většinu referenčních materiálů v relativně dobré shodě se srovnávacími analýzami z téže laboratoře i s dosud publikovanými hodnotami.

Bylo tedy prokázáno, že metoda HG-CT-ICP-MS je vhodná a dostatečně citlivá pro analýzy toxikologicky významných specií arsenu v tak obtížné matrici, jako jsou tkáně mořských živočichů. Je tak vhodná pro rutinní analýzy obdobných vzorků i jako srovnávací metoda k běžněji používaným metodám založených na iontové chromatografii s ICP-MS detekcí.

6. LITERATURA

1. Shakoor, M. B.; Nawaz, F.; Hussain, F.; Raza, M.; Ali, S.; Rizwan, M.; Oh, S.; Ahmed, S.: Human health implications risk assessment and remediation of As-contaminated water: A critical review; *Science of The Total Environment* **601–602**, 756–769 (2017).
2. Naujokas, M. F.; Anderson, B.; Ahsan, H.; Aposhian, H. V.; Graziano, J. H.; Thompson, C.; Suk, W. A.: The broad scope of health effects from chronic arsenic exposure: Update on a worldwide public health problem; *Environmental Health Perspectives* **121**, 295–302 (2013).
3. Hunt, K. M.; Srivastava, R. K.; Elmet, C. A.; Athar, M.: The mechanistic basis of arsenocarcinogenesis: Pathogenesis of skin cancer; *Cancer Letters* **354**, 211–219 (2014).
4. Peng, H.; Hu, B.; Liu, Q.; Li, J.; Li, X. F.; Zhang, H.; Chris Le, X.: Methylated phenylarsenical metabolites discovered in chicken liver; *Angewandte Chemie International Edition* **56**, 6773–6777 (2017).
5. EFSA (European Food Safety Authority): Scientific opinion on arsenic in food. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM); *EFSA Journal* **7(10)**, 1351:1–1351:199 (2009).
6. Cornelis, R.; Caruso, J.; Crews, H.; Heumann, K.: Handbook of elemental speciation II – Species in the environment, food, medicine and occupational health; *John Wiley & Sons, Ltd., Chichester* (2005).
7. ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry): Toxicological profile for arsenic (2007).
8. Wu, D.; Pichler, T.: Preservation of co-occurring As, Sb and Se species in water samples with EDTA and acidification; *Geochemistry: Exploration, Environment, Analysis*. 2015–2369 (2015).

9. Hajeb, P.; Sloth, J. J.; Shakibazadeh, S.; Mahyudin, N. A.; Afsah-Hejri, L.: Toxic elements in food: Occurrence, binding, and reduction approaches; *Comprehensive reviews in food science and food safety* **13(4)**, 457–472 (2014).
10. Rabieh, S.; Hirner, A. V.; Matschullat, J.: Determination of arsenic species in human urine using high performance liquid chromatography coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry; *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **23**, 544–549 (2008).
11. Rehman, K.; Naranmandura, H.: Arsenic metabolism and thioarsenicals; *Metallomic* **4**, 881–892 (2012).
12. Komorowicz, I.; Barańkiewicz, D.: Arsenic and its speciation in water samples by high performance liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry - Last decade review; *Talanta* **84**, 247–261 (2011).
13. Feldmann, J.; Krupp, E. M.: Critical review or scientific opinion paper: Arsenosugars - A class of benign arsenic species or justification for developing partly speciated arsenic fractionation in foodstuffs? *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **399(5)**, 1735–1741 (2011).
14. Cullen, W. R.; Liu, Q.; Lu, X.; McKnight-Whitford, A.; Peng, H.; Popowich, A.; Yan, X.; Zhang, Q.; Fricke, M.; Sun, H.; Chris Le, X.: Methylated and thiolated arsenic species for environmental and health research – A review on synthesis and characterization; *Journal of Environmental Sciences* **49**, 7–27 (2016).
15. Taylor, V.; Goodale, B.; Raab, A.; Schwerdtle, T.; Reimer, K.; Conklin, S.; Karagas, M. R.; Francesconi, K. A.: Human exposure to organic arsenic species from seafood; *Science of The Total Environment* **580**, 266–282 (Supplement C) (2017).
16. Caumette, G.; Koch, I.; Reimer, K. J.: Arsenobetaine formation in plankton: a review of studies at the base of the aquatic food chain; *Journal of Environmental Monitoring* **14(11)**, 2841 (2012).

17. Leffers, L.; Unterberg, M.; Bartel, M.; Hoppe, C.; Pieper, I.; Stertmann, J.; Ebert, F.; Humpf, H. U.; Schwerdtle, T.: In vitro toxicological characterisation of the S-containing arsenic metabolites thio-dimethylarsenic acid and dimethylarsinic glutathione; *Toxicology* **305**, 109–119 (2013).

18. Tukai, R.; Maher, W. A.; McNaught, I. J.; Ellwood, M. J.; Coleman, M.: Occurrence and chemical form of arsenic in marine macroalgae from the east coast of Australia; *Marine and Freshwater Research* **53(6)**, 971–980 (2002).

19. Frumkin, H.; Thun, M. J.: CA: *A Cancer Journal for Clinicians* **51**, 254 (2001).

20. Liu, L.; He, B.; Yun, Z.; Sun, J.; Jiang, G.: Speciation analysis of arsenic compounds by capillary electrophoresis on-line coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry using a novel interface; *Journal of Chromatography A* **1304**, 227–233 (2013).

21. Santos, C. M. M.; Nunes, M. A. G.; Barbosa I. S.; Santos, G. L.; Peso-Aguiar, M. C.; Korn, M. G. A.; Flores, E. M. M.; Dressler, V. L.: Evaluation of microwave and ultrasoned extraction procedures for arsenic speciation in bivalve mollusks by liquid chromatography–inductively coupled plasma-mass spectrometry; *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* **86**, 108–114 (2013).

22. Moreda-Piñeiro, A.; Moreda-Piñeiro, J.; Herbello-Hermelo, P.; Bermejo-Barrera, P.; Muniategui-Lorenzo, S.; López-Mahía, P.; Prada-Rodríguez, D.: Application of fast ultrasound water-bath assisted enzymatic hydrolysis – High performance liquid chromatography–inductively coupled plasma-mass spectrometry procedures for arsenic speciation in seafood materials; *Journal of Chromatography A* **1218(39)**, 6970–6980 (2011).

23. Pokorná, N.: Speciační analýza anorganického arsenu v materiálech mořského původu. Univerzita Karlova, Praha (2016).

24. Pétursdóttir, A. H.; Gunnlaugsdóttir, H.; Krupp, E. M.; Feldmann, J.: Inorganic arsenic in seafood: Does the extraction method matter? *Food Chemistry* **150**, 353–359 (2014).

25. Roerdink, A. R.; Aldstadt, J. H.: Sensitive method for the determination of roxarsone using solid-phase microextraction with multi-detector gas chromatography; *Journal of Chromatography A* **1057**, 177 (2004).
26. Batista, B. L.; Nacano, L. R.; De Souza, S. S.; Barbosa, Jr., F.: Rapid sample preparation procedure for As speciaion in food samples by LC-ICP-MS; *Food Additives & Contaminants: Part A* **29**, 780–788 (2012).
27. Currier, J. M.; Saunders, R. J.; Ding, L.; Bodnar, W.; Cable, P.; Matoušek, T.; Creed, J. T.; Stýblo, M.: Comparative oxidation state specific analysis of arsenic species by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry and hydride generation- -cryotrapping-atomic absorption spectrometry; *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **28**:6, 843–852 (2013).
28. Kitagawa, F.; Shioki, K.; Otsuka, K.: Analysis of arsenic compounds by capillary electrophoresis using indirect UV and mass spectrometric detections; *Electrophoresis* **27**, 2233 (2006).
29. Wang, R. Y.; Hsu, Y. L.; Chang, L. F.; Jiang, S. J.: Speciation analysis of arsenic and selenium compounds in environmental and biological samples by ion chromatography - inductively coupled plasma dynamic reaction cell mass spectrometer; *Analytica Chimica Acta* **590**(2), 239–244 (2007).
30. B' Hymer, C.; Caruso, J. A.: Arsenic and its speciation analysis using high-performance liquid chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry; *Journal of Chromatography A* **1045**, 1–13 (2004).
31. Gong, Z.; Lu, X.; Ma, M.; Watt, C.; Chris Le, X.: Arsenic speciation analysis; *Talanta* **58**, 77–96 (2002).
32. Milstein, L. S.; Essader, A.; Pellizzari, E. D.; Fernando, R. A.; Raymer, J. H.; Levine, K. E.; Akinbo, O.: Development and application of a robust speciation method for determinatiom of six arsenic compounds present in human urine; *Environmental Health Perspectives* **293**, 111 (2003).

33. Xie, Q.; Kerrich, R.; Irving, E.; Liber, K.; Abou-Shakra, F.: Determination of five arsenic species in aqueous samples by HPLC coupled with a hexapole collision cell ICP-MS; *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **17**, 1037 (2002).
34. Álvarez-Llamas, G.; Fernández de laCampa, M.a.d.R.; Sanz-Medel, A.: ICP-MS for specific detection in capillary electrophoresis; *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **24**, 28 (2005).
35. Matoušek, T.; Currier, J. M.; Trojánková, N.; Saunders, R. J.; Ishida, M. C.; González-Horta, C.; Musil, S.; Mester, Z.; Stýblo, M.; Dědina, J.: Selective hydride generation-cryotrapping-ICP-MS for arsenic speciation analysis at program levels: analysis of river and sea water reference materials and human bladder epithelial cells. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **28**, 1456–1465 (2013).
36. Hernández-Zavala, A.; Matoušek, T.; Drobná, Z.; Paul, D. S.; Walton, F.; Adair, B. M.; Dědina, J.; Thomas, D. J.; Stýblo, M.: Speciation analysis of arsenic in biological matrices by automated hydride generation-cryotrapping-atomic absorption spectrometry with multiple microflame quartz tube atomizer (multiatomizer); *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **23**, 342–351 (2008).
37. Welna, M.; Szymczycha-Madeja, A.; Pohl, P.: Comparison of strategies for sample preparation prior to spectrometric measurements for determination and speciation of arsenic in rice; *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **65**, 122–136 (2015).
38. Currier, J. M.; Svoboda, M.; Matoušek, T.; Dědina, J.; Stýblo, M.: Direct analysis and stability of methylated trivalent arsenic metabolites in cells and tissues; *Metallomics* **3**, 1347–1354 (2011).
39. Matoušek, T.; Hernández-Zavala, A.; Svoboda, M.; Langerová, L.; Adair, B. M.; Drobná, Z.; Thomas, D. J.; Stýblo, M.; Dědina, J.: Oxidation state specific generation of arsines from methylated arsenicals based on L-cysteine treatment in buffered media for speciation analysis by hydride generation-automated cryotrapping-gas chromatography-atomic absorption spectrometry with the multiatomizer; *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* **63**, 396–406 (2008).

40. Chen, B.; Corns, W. T.; Stockwell, P. B.; Huang, J. H.: Accurate fast screening for total and inorganic arsenic in rice grains using hydride generation atomic fluorescence spectrometry (HG-AFS); *Analytical Methods* **6**, 7554–7558 (2014).
41. Cerveira, C.; Pozelon, D.; Pompéu de Moreas, D.; Silva de Fraga, J. C.: Speciation of inorganic arsenic in rice using hydride generation atomic absorption spectrometry (HG-AAS); *Analytical Methods* **7**, 4528–4534 (2015).
42. Rasmussen, R. R.; Qian, Y.; Sloth, J. J.: SPE-HG-AAS method for the determination of inorganic arsenic in rice—results from method validation studies and a survey on rice products; *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **405**, 7851–7857 (2013).
43. Silbergeld, E. K.; Nachman, K.: The environmental and public health risks associated with arsenical use in animal feeds; *Annals of the New York Academy of Sciences* **1140**, 346–357 (2008).
44. Francesconi, K. A.: Arsenic species in seafood: Origin and human health implications; *Pure and Applied Chemistry* **82(2)**, 373–381 (2010).
45. Borak, J.; Hosgood, H. D.: Seafood arsenic: Implications for human risk assessment; *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **47(2)**, 204–212 (2007).
46. Sloth, J. J.; Julshamn, K.: Survey of total and inorganic arsenic content in blue mussels (*Mytilus edulis* L.) from Norwegian fiords: Revelation of unusual high levels of inorganic arsenic; *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56(4)**, 1269–1273 (2008).
47. Australia New Zealand Food Standards Code (2013). Standard 1.4.1 – Contaminants and natural toxicants. Federal Register of Legislative Instruments F2013C00140 Issue: 139
48. Commission Regulation, Number 1881/2006 – Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Official Journal of the European Communities, L364, 5–24 (2006).

49. IARC (International Agency for Research on Cancer): A review of human carcinogens (2012).
50. Pétursdóttir, A. H.; Sloth J. J.; Feldman, J.: Introduction of regulations for arsenic in feed and food with emphasis on inorganic arsenic, and implications for analytical chemistry; *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **407**, 8385–8396 (2015).
51. Marschner, K.; Musil, S.; Dědina, J.: Determination of methylated arsenic species during generation of arsanes with tetrahydridoborate (1-) in acidic media; *Analytical Chemistry* **88(12)**, 6366–6373 (2016).
52. Rasmussen, R. R.; Hedegaard, R. V.; Larsen, E. H.; Sloth, J. J.: Development and validation of an SPE HG-AAS method for determination of inorganic arsenic in samples of marine origin. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **403**, 2825–2834 (2012).
53. Zmozinski, A. V.; Llorente-Mirandes, T.; López-Sánchez, J. F.; Silva, M. M.: Establishment of a method for determination of arsenic species in seafood by LC-ICP-MS; *Food Chemistry* **173**, 1073–1082 (2015).
54. Liu, L.; Yun, Z.; He, B.; Jiang, G.: Efficient interface for online coupling of capillary electrophoresis with inductively coupled plasma – mass spectrometry and its application in simultaneous speciation analysis of arsenic and selenium. *Analytical Chemistry* **86**, 8167–8175 (2014).
55. Leufroy, A.; Noël, L.; Beauchemin, D.; Guérin, T.: Bioaccessibility of total arsenic and arsenic species in seafood as determined by a continuous online leaching method. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **402**, 2849–2859 (2012).
56. Wolle, M. M.; Conklin, S. D.: Speciation analysis of arsenic in seafood and seaweed: Part II–single laboratory validation of method; *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2018).

57. Kumkrong, P.; Thiensong, B.; Le, P. M.; McRae, G.; Windust, A.; Deawtong, S.; Meija, J.; Maxwell, P.; Yang, L.; Mester, Z.: Species specific isotope dilution for the accurate and SI traceable determination of arsenobetaine and methylmercury in cuttlefish and prawn; *Analytica Chimica Acta* **943**, 41–49 (2016).
58. Marschner, K.; Pétursdóttir, A. H.; Bucker, P.; Raab, A.; Feldmann, J.; Mester, Z.; Matoušek, T.; Musil, S.: Update and validation of selective hydride generation of inorganic arsenic for fast screening of samples of marine origin; Unpublished results (2018).